

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

10/088868

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 03 OCT 2000

WIPO PCT

EP00/8919

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung

4

Aktenzeichen: 199 45 351.9

Anmeldetag: 22. September 1999

Anmelder/Inhaber: LTS LOHMANN Therapie-Systeme AG,
Andernach/DE

Bezeichnung: Verfahren zum Auffinden und zur Isolierung
pharmakologisch wirksamer Verbindungen
aus Substanzgemischen sowie eine Vorrichtung
zur Durchführung des Verfahrens

IPC: G 01 N 33/15

Bemerkung: Der Firmensitz der Anmelderin war bei Ein-
reichung dieser Anmeldung Neuwied/DE

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 03. August 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Weihmayer

Verfahren zum Auffinden und zur Isolierung pharmakologisch wirksamer Verbindungen aus Substanzgemischen sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

5 Beschreibung

Die Arzneimittelforschung hat sich, ausgehend von der Nutzung ausschliesslich natürlicher Quellen über die chemische Synthese von Wirkstoffen und deren Prüfung durch Tierversuche zum gezielten computergestützten Strukturdesign von Wirkstoffen mit Hilfe des Einsatzes experimenteller und theoretischer Methoden hin entwickelt.

15 Mit zunehmender Kenntnis der verschiedenen Krankheitsursachen (z. B. das Fehlen oder die genetisch bedingte Veränderung eines Proteins) ist die Arzneimittelforschung und die Therapie mit Arzneimitteln wesentlich komplexer geworden. So konnten in den vergangenen zehn Jahren mittels molekularbiologischer Methoden (Humanes Genom Projekt) die genetischen Ursachen einiger primär neurodegenerativer Erkrankungen wie des Morbus Alzheimer, des Morbus Parkinson, des Morbus Huntington, der Amyotrophen Lateralsklerose, der Prionkrankheiten und verschiedener ataxischer Syndrome aufgeklärt werden. Dieses Erkennen der den Krankheiten zugrundeliegenden biologischen Veränderungen stellt die Grundlage für einen Wechsel von einer symptomatischen, palliativen hin zu einer kausalen Therapie dar.

20
25 100 bis 150 der circa 30.000 in der Medizin beschriebenen Krankheiten sind so relevant, dass sie sich als Forschungsprojekte für die Pharmaindustrie eignen. Die derzeit zur Verfügung stehenden Medikamente zielen auf eine therapeutische Beeinflussung von ca. 400 Rezeptoren, Enzymen und anderen Biomolekülen. Man geht jedoch davon aus, dass etwa bis zu 10.000 Gene und deren Produkte als Target
30 für die Wirkstoffforschung in Frage kommen. Der Nachweis ihrer pathologischen Relevanz erfordert unter anderem aussagekräftige molekulare und zelluläre Systeme.

Neben dem rationalen Design, das die Optimierung von Stoffeigenschaften aufgrund von Erfahrungswerten oder basierend auf bekannten molekularen Strukturen einbezieht, spielen derzeit die Kombinatorische Chemie und die in der Entwicklung befindliche Kombinatorische Biosynthese eine grosse Rolle in der
5 Arzneimittelforschung.

Eine bedeutende Schwachstelle dieser Methoden ist die eingeschränkte Diversität synthetischer Substanzen, verglichen mit der strukturellen Komplexität pflanzlicher und mikrobieller Sekundärmetabolite.

Um diese natürliche Vielfalt erschliessen zu können, ist eine enge Verknüpfung der klassischen Naturstoffforschung mit der molekularen Medizin und der organischen Chemie unumgänglich. Auf der Suche nach neuen Leitstrukturen erfolgt die Auswahl pflanzlicher und tierischer Organismen sowie der Pilze und Mikroorganismen nach
15 dem Zufallsprinzip, unter chemotaxonomischen Gesichtspunkten, aufgrund ökologischer Beobachtungen und aufgrund ethnomedizinischer Vorkenntnisse.

Das Auffinden einer oder mehrerer wirksamer Komponente(n) aus Substanzgemischen wie z. B. aus durch Kombinatorische Chemie erstellten Substanzbibliotheken oder aus Naturstoffextrakten ist jedoch sehr aufwendig.
20

Naturstoffextrakte z. B. bestehen im allgemeinen aus einer Vielzahl (bis zu 2.000) unterschiedlichster, den gesamten Polaritätsbereich umfassenden Substanzen, was durch verschiedenartige Grundstrukturen und funktionelle Gruppen bedingt ist. In der
25 Regel machen hier nur relativ wenige Verbindungen bereits ca. 80 % des

Extraktgewichtes aus, während die Überzahl der restlichen Verbindungen jedoch in geringer Konzentration bis hin zum ppm-Bereich, also nicht-equimolar vorliegen. Häufig zeigen in einem solchen Extrakt aber nur wenige oder sogar nur eine einzige Substanz die charakteristische biologische Aktivität, wobei diese Aktivität auf eine im
30 Extrakt in Spuren vorliegende Substanz zurückzuführen sein kann.

Bisher erfolgt das Aufarbeiten und Analysieren der meist chromatografisch getrennten Inhaltsstoffe eines natürlichen Extrakts oder einer mittels Kombinatorischer Chemie hergestellten umfangreichen Substanzbibliothek in der Regel unter Anwendung von automatisierten Testsystemen mit extrem hohem Durchsatz (High-throughput Screening; HTS). Dieses Verfahren ist jedoch sehr aufwendig und kostenintensiv. So ist es erforderlich, aus der Naturstoffquelle (z. B. Pflanze, Tier, Pilz, Mikroorganismus) zunächst selektive Extrakte mit Lösungsmitteln steigender Polarität herzustellen und diese biologisch zu testen. Weitere Tests erfolgen nach der Bildung von Unterfraktionen aus dem jeweils wirksamen selektiven Extrakt.

Schliesslich muss ein letzter Test zeigen, welche Reinsubstanz(en) nach Isolierung aus der wirksamen Fraktion biologische Aktivität zeigen und somit einen "Hit" darstellen. Für die chromatografische Auftrennung in Unterbibliotheken und deren Testung werden jeweils mehrere Wochen benötigt. Um ausreichende Mengen der Reinsubstanz(en) gewinnen zu können, muss daher der Start mit grossen Extraktmengen erfolgen. Auch dies ist verbunden mit hohen Kosten für präparative HPLC-Säulen und den hohen Lösungsmittelbedarf (sowohl Anschaffung als auch Entsorgung).

Bereits durch die Auftrennung in Unterfraktionen, aber erst recht durch die Isolierung der reinen Naturstoffe gehen eventuell vorhandene synergistische oder antagonisierende Effekte der einzelnen Komponenten des Extraktes im Hochdurchsatz-Screening verloren. So kann ein im ersten Test wirksamer Extrakt seine biologische Wirksamkeit einbüssen, weil das Auftrennen zu einzelnen Substanzen eine Targetbindung, die nur im Zusammenspiel verschiedener Komponenten möglich war, verhindert.

Ein Verfahren zum Auffinden wirksamer Komponenten aus einer synthetischen, durch Kombinatorische Chemie erstellten Peptidbibliothek, die aus maximal 19 chemisch sehr ähnlichen, sich nur durch Austausch von Aminosäuren ergebenden und in equimolaren Mengen vorliegenden Peptiden besteht, wird von Zuckermann et

al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4505-4509 (1992) beschrieben. Dazu wurde ein Antikörper im Unterschuss zu einer solchen Peptid-Substanzbibliothek gegeben und der Target (=Antikörper)-Peptid-Komplex durch schnelle Gelfiltration abgetrennt. Das Peptid wird aus dem Komplex mit 1% Trifluoressigsäure freigesetzt und die Struktur durch Massenspektroskopie und Aminosäureanalyse aufgeklärt. Dieses Verfahren eignet sich aber nicht zur Isolierung von Target-Molekül-Komplexen kleinerer Moleküle (Molekulargewicht kleiner oder gleich 1500), da die Gelfiltration nur mit grösseren Molekulargewichtsunterschieden technisch funktioniert. Auch erfordert es nach Aussage der Autoren equimolare Mischungen. Weiterhin ist die Ermittlung synergistisch wirkender Kombinationen von Liganden unmöglich bzw. dem Zufall überlassen.

Auch die von Wieboldt et al. in *Anal. Chem.*, 69, 1683-1691 (1997) beschriebenen Experimente sind ebenfalls auf equimolare Gemische von 20 bis 30 eng verwandte Moleküle (synthetisch hergestellte Derivate mit einer allgemeinen 1,4-Benzodiazepin-Struktur) gerichtet. Die eingeschränkte Diversität der synthetischen Substanzen erleichtert zwar die experimentelle Bearbeitung, stellt aber zugleich einen begrenzenden Faktor für ihre Anwendbarkeit dar.

Ebenso benötigt die von R. B. van Breemen et al. in *Anal. Chem.*, 69, 2159-2164 (1997) beschriebene gepulste Ultrafiltration Massenspektrometrie eine equimolare Substanzbibliothek mit 20 Substanzen. Da nur mit organischen Lösemitteln freigesetzt wird, können kovalent gebundene Substanzen nicht entdeckt werden.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher die Entwicklung einer schnell durchführbaren und effizienten Methode zum Auffinden und zur Isolierung von biologisch, z. B. pharmakologisch aktiven chemischen Substanzen und Substanzkombinationen, insbesondere aus nicht equimolaren Gemischen wie Naturstoffextrakten (z. B. aus Pflanze, Tier, Pilz, Mikroorganismus).

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, das durch folgende Schritte gekennzeichnet ist:

- 5
- a) Hinzufügen eines Targets zu einem Gemisch von chemischen Substanzen, z. B. einem Naturstoffextrakt,
 - b) Bildung mindestens eines Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz, wobei diese chemische Substanz an das Target gebunden wird,
 - c) Abtrennung der nicht gebundenen chemischen Substanzen des Gemisches von dem mindestens einen Komplex und ggf. deren analytische (z. B. chromatografische) Erfassung (= Hauptversuch).

15 Die in einem separaten Versuch ohne Target (Blindprobe) zu ermittelnden, zusätzlich oder in höheren Konzentrationen auftretenden Substanzen stellen die Summe aller vom Target gebundenen Substanzen dar. Diese werden isoliert und strukturell aufgeklärt.

Als weitere Schritte zur Aufarbeitung des Komplexes können aber auch die:

- 20
- d) Freisetzung der im Komplex an das Target gebundenen mindestens einen aktiven chemischen Substanz unter Zerstörung der Bindung zwischen aktiver chemischer Substanz und dem Target im Komplex, die
 - e) Abtrennung der mindestens einen freigesetzten aktiven chemischen Substanz und die
 - f) Identifizierung der mindestens einen abgetrennten aktiven chemischen Substanz und ggf. der Vergleich mit den im Schritt c) identifizierten Substanz(en)
- 25

in Frage kommen.

30 Unter einem biologischen Target versteht man ein Protein (z. B. Rezeptor, Enzym, Antikörper), eine biologische Membran oder eine ganze (gesunde oder Krebs-)Zelle. Bei Kontakt, insbesondere bei Bindung zwischen einer passenden aktiven chemischen Substanz mit diesem Target kann die Auslösung einer Reaktion erfolgen,

die für das Target charakteristisch ist und meist mit einem biochemischen Prozess in Verbindung steht. Mit anderen Worten: Die aktive chemische Substanz besitzt eine starke Affinität zu dem speziellen Target. Beispiele für solche Targets sind die Proteine Thrombin, Trypsin und der β_2 -Adrenorezeptor.

5

Als "chemische Substanz" kommen praktisch alle aus der organischen und Naturstoffchemie bekannten, einheitlichen Stoffe in Frage. Hierzu zählen niedermolekulare und hochmolekulare chemische Stoffe, nicht jedoch Polymere aus einer unbekannten Zahl von Monomereinheiten. Dem Fachmann sind solche chemisch einheitlichen Stoffe der organischen Chemie bekannt. Hierzu zählen aliphatische, aromatische und cyclische Kohlenwasserstoffe und Verbindungen mit funktionellen Gruppen, wie Carbonsäuren, Alkohole, Ester, Aldehyde, Lactone, Amide, Heterocyclen, Isoprenoide, Terpene, Kohlenhydrate, Steroide etc. Auch Glykoside, Peptide, Proteine und Enzyme können als eine geeignete chemische Substanz in Frage kommen.

15

Die Molekülmassen geeigneter chemisch einheitlicher Substanzen liegen im allgemeinen oberhalb von $M_r = 150$. So besitzen beispielsweise die bekannten Neurotransmitter Acetylcholin $[H_3CCO-O-CH_2-CH_2-N(CH_3)_3]OH$ und Nicotin

20

Molekülmassen von $M_r = 163$ bzw. $M_r = 162$ und beschreiben somit praktisch die Untergrenze der Molekülmasse der geeigneten chemischen Substanzen. Die Obergrenze der Molekülmasse ist prinzipiell nicht beschränkt. So sind hochmolekulare Proteine (M_r bis etwa 300.000) aufgrund ihrer spezifischen Reaktion mit ganz speziellen biologischen Targets durchaus interessante aktive chemisch einheitliche Substanzen, die durch das erfindungsgemäße Verfahren aus einem Gemisch verschiedener chemischer Substanzen abgetrennt werden können.

25

Uneinheitliche Biopolymere wie z. B. Glykogen, Cellulose etc. kommen für das erfindungsgemäße Verfahren nicht in Frage kommen, weil sie wegen einer undefinierten Zahl von Monomereinheiten keine chemisch einheitlichen Substanzen im Sinne der vorliegenden Erfindung darstellen.

30

Bei den chemischen Substanzen ist weiterhin zwischen aktiven und inaktiven chemischen Substanzen zu unterscheiden. Unter einer aktiven chemischen Substanz ist eine solche zu verstehen, die befähigt ist, bei Bindung zu einem speziellen Target eine dafür charakteristische Reaktion auszulösen. Eine aktive chemische Substanz ist dadurch charakterisiert, dass sie eine Affinität zum Target besitzt. Eine inaktive chemische Substanz braucht keine Affinität zum Target zu besitzen.

Eine echte Obergrenze der Molmasse der in Frage kommenden chemischen Substanz kann daher nicht beziffert werden. Vielmehr wird nur die Einfachheit der Aufarbeitung im wesentlichen durch das Verhältnis der Molmasse der aktiven chemischen Substanz zur Molmasse des Targets festgelegt. Die Molmasse dieses Targets ist im allgemeinen sehr hoch, und kann z. B. oberhalb von 1 Million liegen. Wie gesagt kann das Target auch eine ganze Zelle sein. Chemische Substanzen mit kleiner Molmasse (etwa 150 bis etwa 30.000) sind von solchen Targets aufgrund der grossen Massendifferenz leicht durch konventionelle Verfahren wie Ultrazentrifugation abzutrennen. Wenn aber die Molmasse der aktiven chemischen Substanz und die Molmasse des Targets in vergleichbaren Grössenordnungen liegen, liefert auch die Ultrazentrifugation nur noch unbefriedigende Trennergebnisse und man muss anspruchsvollere oder zusätzliche Trennverfahren anwenden.

Unter einem "Gemisch von chemischen Substanzen" ist eine Mischung von verschiedenen chemischen Substanzen zu verstehen, die mindestens eine aktive chemische Substanz enthält, die das oben genannte Kriterium erfüllt, d. h. die eine Reaktion bei Kontakt an einem speziellen Target auszulösen vermag. Das Gemisch kann auch mehrere solcher aktiver chemischer Substanzen enthalten. Weiterhin kann das Gemisch auch chemische Substanzen enthalten, die keine Reaktion an einem biologischen Target auszulösen vermögen. In der Regel stellen die inaktiven chemischen Substanzen den Hauptanteil in dem Gemisch verschiedener chemischer Substanzen dar. Insbesondere sind die im Gemisch von chemischen Substanzen enthaltenen inaktiven chemischen Stoffe nur in Bezug auf ein speziell ausgewähltes

Target inaktiv, sind aber durchaus in der Lage, an einem anderen Target eine solche Reaktion auszulösen.

5 In der Praxis handelt es sich bei dem Gemisch chemischer Substanzen bevorzugt um Substanzbibliotheken, die synthetisch oder mit Hilfe der Kombinatorischen Chemie hergestellt werden oder um einen Naturstoffextrakt. Unter einem Naturstoffextrakt im Sinne dieser Definition sind somit komplexe Gemische chemisch einheitlicher Substanzen zu verstehen, die aus einer biologischen Quelle stammen und vorzugsweise aus Pflanzen, Pflanzenteilen wie Blättern, Blüten, Holz, Wurzeln, Rinde etc., Pilzen, Tieren, Drüsen, Eiern und Exkrementen von Tieren, Mikroorganismen etc. gewonnen werden. Dies geschieht durch bekannte Verfahren, z. B. Wasserdampfdestillation, trockene Destillation, Extraktion mit Wasser, organischen, anorganischen oder überkritischen Lösungsmitteln; häufig auch unter gleichzeitiger bzw. anschliessender chemischer Weiterverarbeitung wie Veresterung, Verseifung, 15 Salzbildung, Hydrierung, Dehydratation, Isomerisierungen, Alkylierungen, Fermentation, enzymatischer Abbau etc. Die so gewonnenen Naturstoffextrakte entsprechen also, was die Zusammensetzung ihrer Inhaltsstoffe anbetrifft, mitunter nicht mehr der in der biologischen Quelle vorliegenden Zusammensetzung. Im allgemeinen sind aber eine Vielzahl, d. h. mindestens 50 unterschiedlichster 20 chemischer Substanzen vorhanden, darunter – wie bereits gesagt – zahlreiche nur in Spuren, d. h. in einer Konzentration von nur einigen ppm. Häufig zeigen in einem solchen Extrakt aber nur wenige oder sogar nur eine einzige Substanz die charakteristische biologische Aktivität, wobei diese Aktivität auf eine im Extrakt nur in Spuren vorliegende Substanz zurückzuführen sein kann. Das Gemisch chemischer 25 Substanzen kann auch ein Gemisch verschiedener Naturstoffextrakte sein. Im konkreten Beispiel wurde ein Extrakt aus Löwenzahn (*Taraxacum officinale*) gewählt. Besonders wichtige biologische Quellen stellen natürlich die Heilpflanzen dar, deren Extrakte physiologische und / oder pharmakologische Wirkungen besitzen und zum Teil im DAB und HAB genannt werden.

Das "Hinzufügen" des Targets zu dem Gemisch von chemischen Substanzen erfolgt vorzugweise in Lösung, Suspension oder Dispersion. In vielen Fällen kann das Hinzufügen in einer wässrigen Lösung, insbesondere in einer, deren pH-Wert mit Hilfe eines geeigneten Puffers stabilisiert wird, erfolgen. Es ist ein besonderer Vorteil der hier beschriebenen Methode, dass eine vorangehende Auftrennung des Gemisches von chemischen Substanzen in mehrere verschiedene Fraktionen bis zu reinen chemischen Substanzen vor dem Hinzufügen des Targets nicht erfolgt.

Mit einem "Komplex" ist ein isolierbares Teilchen gemeint, welches aus dem Target besteht, an das mindestens eine aktive chemische Substanz gebunden ist. Ein Target kann auch zwei oder mehrere aktive chemische Substanzen an sich binden. Die in einem solchen Komplex an das Target gebundenen zwei oder mehr aktiven chemischen Substanzen können in einem bestimmten, charakteristischen Verhältnis zueinander vorliegen, welches hinsichtlich der spezifischen Reaktion des speziellen Targets einer synergistischen Wirkung entspricht. Der Fachmann spricht wegen der häufigen Konstellation, dass als Target ein Protein gewählt wird, auch von Protein-Ligand-Komplexen.

Im Komplex ist die mindestens eine aktive chemische Substanz an das Target "gebunden". Dabei spielt die Art der Bindung zwischen Target und der oder den aktiven chemischen Substanz(en) grundsätzlich keine Rolle. Am häufigsten treten kovalente oder nicht-kovalente Bindungen auf. Zu letzteren zählen z. B. Wasserstoffbrücken, elektrostatische Wechselwirkungen, z. B. zwischen entgegengesetzt geladenen Gruppen, Metallkomplexierung, Wechselwirkungen von lipophilen Gruppen der aktiven chemischen Substanz mit hydrophoben Bereichen (sog. Taschen) des Targets, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Kation- π -Wechselwirkungen. Es ist auch oft die Kombination verschiedener Wechselwirkungen, die die Affinität einer aktiven chemischen Substanz zum Target verursachen.

Die "Abtrennung" des mindestens einen Komplexes von den nicht gebundenen, d. h. den "freien" inaktiven chemischen Substanzen des Gemisches erfolgt grundsätzlich mit üblichen Methoden, wobei besonders vorteilhaft Verfahren ohne thermische Belastung des Komplexes gewählt werden. Dazu zählen Filtration, Ultrafiltration, Zentrifugation, Ultrazentrifugation, Gleichgewichtsdialyse, Gelfiltration oder Präzipitation des Komplexes. Die Identifizierung der mindestens einen an das Target gebundenen "aktiven" chemischen Substanz kann mitunter vor der Freisetzung dieser chemischen Substanz aus dem Komplex, z. B. mit Flugzeitmassenspektroskopie (MALDI-TOF) erfolgen.

Die Filtration stellt eine besonders schnelle, einfache und effiziente Separationsmethode dar. Sie kann als Ultrafiltration (z. B. unter Anwendung von Microcon-Filtereinheiten der Firma Amicon) oder mit speziellen Filtrationsgeräten (z. B. Brandel-Zellsammler) durchgeführt werden.

Die "Freisetzung" der mindestens einen aktiven chemischen Substanz aus dem Komplex erleichtert jedoch ihr Auffinden, Isolieren und insbesondere ihre chemische Charakterisierung. Sie schliesst sich dem Trennungsschritt nach zwei oder mehr Waschgängen zur Entfernung unspezifisch adsorbierter Substanzen an. Es wird

dadurch die Freisetzung der gebundenen aktiven chemischen Substanzen aus dem Komplex erzielt. Dabei wird die Bindung, die im Komplex zwischen Target und der mindestens einen aktiven chemischen Substanz besteht, wieder gelöst. Man verwendet dazu – abhängig von der Natur der Bindung – physikalische oder chemische Methoden. Das kann z. B. mittels einer sauren, wässrig-nieder-alkanolischen Lösung, bevorzugt mit einem Gemisch von Trifluoressigsäure/ Methanol/Wasser, z. B. der Zusammensetzung 1/49,5/49,5 (Vol.-%), erfolgen.

Man kann auf den Freisetzungsschritt verzichten, wenn eine Identifizierung der aktiven chemischen Substanz nicht erforderlich ist bzw. wenn der Komplex als solcher identifiziert wird. Man muss auf die Freisetzung verzichten, wenn sich die aktive Substanz durch die Freisetzungsbedingungen verändert werden würde oder sich

nicht durch die Freisetzungslösung abtrennen lässt. Dies ist hauptsächlich bei einigen kovalenten Bindungen der Fall. In diesen Fällen erfolgt die Identifizierung der aktiven chemischen Substanz aus der Differenz der Filtrate mit Target (= Hauptversuch) und ohne Target (Blindprobe). Dieses Verfahren erlaubt es, alle vom Target gebundenen chemischen Substanzen gleichzeitig zu erfassen, während die Freisetzung in der Regel nur wenige (z. B. eins bis drei) aktive chemische Substanzen ergibt, wobei man zudem nicht sicher sein kann, dass sie unverändert sind.

Die in der Blindprobe zusätzlich oder in höherer Konzentration auftretenden Substanzen stellen die potentiell aktiven chemischen Substanzen dar. Sie können mit einer beliebigen Trennmethode (z. B. chromatografisch) auch in grösseren Mengen aus dem Gemisch chemischer Substanzen (z. B. dem Naturstoffextrakt) isoliert werden.

Die "Abtrennung" der mindestens einen freigesetzten aktiven chemischen Substanz von dem Target nach Zerstörung der im Komplex bestehenden Bindung kann mit denselben, grundsätzlich bekannten Methoden erfolgen, die bereits genannt wurden. Auch hier werden bevorzugt die einfachsten und zweckmässigsten Methoden angewandt, d. h. Filtration und Zentrifugation. Die Abtrennung der aktiven chemischen Substanz(en) kann auch mittels präparativer HPLC erfolgen.

Die "Identifizierung" der in der Blindprobe zusätzlich oder in höherer Konzentration auftretenden Substanzen und der mindestens einen abgetrennten aktiven chemischen Substanz erfolgt durch übliche Methoden, wie HPLC, z. B. konventionelle analytische HPLC, Micro-HPLC, Kapillar-HPLC oder Nano-HPLC, oder durch Elektrochromatografie, Elektrophorese oder Kopplungstechniken von LC-MS oder MS-MS. Die Identifizierung der aktiven chemischen Substanz(en) mittels der genannten Methoden kann allerdings auch bereits vor ihrer Freisetzung aus dem Komplex erfolgen.

Das erfindungsgemässe Verfahren unterscheidet sich grundsätzlich vom bekannten Hochdurchsatz-Screening, und zwar im wesentlichen dadurch, dass durch das gezielte Bilden eines Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz und dem nachfolgenden Abtrennen der nichtgebundenen inaktiven chemischen Substanzen (Hauptversuch) und der Differenz zur Blindprobe mittels dieses geeigneten speziellen Targets eine einzige oder einige wenige aktive chemische Substanz(en), die sich an das entsprechende Protein binden (sog. "Liganden"), aus einer Substanzbibliothek oder aus einem komplexen Naturstoffgemisch isoliert und identifiziert werden können.

Anstatt jede potentiell interessante chemische Substanz einzeln zu isolieren und dem Target zuzuführen, präsentiert man dieses dem Substanzgemisch. Die sich nach Erkennung entsprechend Emil Fischers "Schlüssel-Schloss-Prinzip" bildenden Komplexe werden z. B. durch Ultrafiltration von den ungebundenen niedermolekularen chemischen Substanzen abgetrennt und durch vergleichende Chromatografie (targetfreie [= Blindprobe] versus targethaltige [= Hauptversuch] Probe) identifiziert. Aus den Komplexen werden dann zur Bestätigung der Ergebnisse die Liganden (die aktiven chemischen Substanzen) zusätzlich freigesetzt – soweit diese stabil und freisetzbar sind –, durch übliche Methoden identifiziert, isoliert und mit den gängigen Methoden der Analytik strukturell aufgeklärt.

Das erfindungsgemässe Verfahren erfordert weder grosse Protein- noch Extraktmengen, benötigt durch Downscaling auf Mikromethoden in der Analytik geringe Lösungsmittelvolumina, erfordert keine zeitintensive Unterfraktionierung, und ermöglicht die Entdeckung synergistisch wirkender Substanzkombinationen. Auf Radioaktiv- und Fluoreszenzmarkierungen kann verzichtet werden. Das erfindungsgemässe Verfahren ermöglicht natürlich auch die Aufarbeitung grösserer Extraktmengen, wobei aktive chemische Substanzen "gefischt" werden können, deren Eigenschaften für die Weiterverwendung dieses Extraktes unerwünscht sind.

Besonders vorteilhaft kann das Verfahren eingesetzt werden, wenn aus grösseren Mengen solcher Extrakte nur die aktiven chemischen Substanzen "gefischt" werden sollen, die eine Wechselwirkung mit dem betreffenden Target zeigen. Die mindestens eine abgetrennte aktive chemische Substanz kann dann anstelle des

5 Naturstoffgemisches als wirksames Prinzip eines Arzneimittels weiterverwendet werden. Dies ist auch dann von Bedeutung, wenn mehr als eine aktive chemische Substanz des Naturstoffextraktes mit dem Target einen Komplex bildet und das relative Verhältnis der mehr als einen aktiven chemischen Substanz zueinander für die biologische Wirksamkeit des Naturstoffextrakts eine dominierende Rolle spielt (Synergieeffekt).

Ein Vorteil dieses Verfahrens liegt somit auch in der Möglichkeit zur Identifizierung von wirksamen (synergistischen) Substanzkombinationen, die beim Hochdurchsatz-Screening von Einzelsubstanzen nicht zugänglich sind.

15

Schliesslich konnte mit Hilfe dieses Verfahrens auch die Erkennungsgrenze (Nachweisgrenze) für aktive chemische Substanzen wider Erwarten in den mikromolaren K_i -Wert-Bereich hinein verschoben werden; d. h. Komplexe aus einem Target und einer aktiven chemischen Substanz mit einem K_i -Wert von $1,7 \mu\text{M}$ waren nachweisbar.

20

Die folgenden Beispiele dienen der anschaulichen Darstellung des erfindungsgemässen Verfahrens.

25

Beispiel 1: Isolierung eines Thrombinhemmstoffes vom 4-Amidinophenylalanin-Typ aus einer willkürlich ausgewählten Substanzbibliothek.

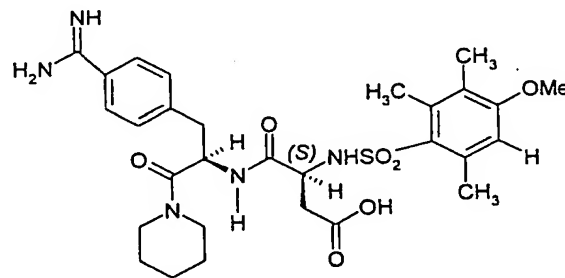
30

Als Target wurde die Serinprotease Thrombin gewählt. Als Substanzen der Substanzbibliothek (des Gemisches "inaktiver" chemischer Substanzen im Sinne der vorigen Definition) wurden die folgenden fünf Arzneistoffe ausgewählt und zwar

unter Berücksichtigung ihrer Wasserlöslichkeit, ihrer Absorptionsmaxima und ihrer chromatografischen Trennbarkeit:

1. der zentral angreifende α_2 -Adrenorezeptor-Agonist Clonidin-HCl
2. das Mucolytikum Bromhexin-HCl
- 5 3. das tricyclische Antidepressivum Amitryptilin-HCl
4. das Neuroleptikum vom Phenothiazin-Typ Chlorpromazin-HCl
5. das Neuroleptikum vom Phenothiazin-Typ Chlorprotixen-HCl

Als Thrombinhemmstoff (die aktive chemische Substanz) wurde die Verbindung CRC 220 der Behringwerke (Marburg, $K_i = 2,5 \text{ nM}$) mit der folgenden Strukturformel verwendet:



Die untersuchten Assays hatten folgende Zusammensetzung:

Tabelle 1

Probe	Blindprobe ohne Thrombin	Hauptversuch mit Thrombin
Thrombin 2000 E/mg	0	1 nmol 5 µmol/l
Clonidin-HCl	2 nmol 10 µmol/l	2 nmol 10 µmol/l
Bromhexin-HCl	2 nmol 10 µmol/l	2 nmol 10 µmol/l
Amitriptylin HCl	2 nmol 10 µmol/l	2 nmol 10 µmol/l
Chlorpromazin-HCl	2 nmol 10 µmol/l	2 nmol 10 µmol/l
Chlorprothixen-HCl	2 nmol 10 µmol/l	2 nmol 10 µmol/l
CRC 220	2nmol 10 µmol/l	
0,9 % NaCl in Wasser (reinst)	ad 200 µl	ad 200 µl

- 5 Die Inkubation der Substanzbibliothek und des Inhibitors mit Thrombin erfolgte innerhalb 1 Stunde bei Raumtemperatur; Lösungsmittel: 0,9 % NaCl in H₂O. Die Abtrennung der gebildeten Protein-Ligand-Komplexe erfolgte durch Ultrafiltration (zentrifugal). Alle Filtrationsvorgänge bzw. Waschungen wurden bis zur Trockenheit der Filter durchgeführt.

10

Filter: Microcon 10 (Amicon)

Zentrifugationsbedingungen: 9981xg, Raumtemperatur

Waschschritte: 2 x mit je 150 µl 0,9 % NaCl in H₂O, 4 °C

- 15 Nach der Ultrafiltration und Analyse des Filtrats folgten Waschschritte und die Freisetzung des Liganden (der aktiven chemischen Substanz) aus dem auf dem

Filter verbliebenen Protein-Ligand-Komplex durch Behandlung mit 200 µl Wasser/Methanol/TFA (49,5/49,5/1) bei Raumtemperatur.

5 Die Blindprobe (ohne Thrombin) wurde in allen Schritten analog behandelt, so dass ein Vergleich der Filtrate möglich ist. Die bei allen Schritten erhaltenen Filtrate wurden mittels Speed-VAC Concentrator getrocknet und später im entsprechenden HPLC-Fliessmittel definierter Menge unter Anwendung von Ultraschall und Schütteln gelöst.

Die Identifizierung der Liganden erfolgte durch analytische HPLC: stationäre Phase Hypersil C 18 BDS, 3 µm, 150 * 0,3mm, Fusica (LC Packings) – mobile Phase: Acetonitril/Wasser/TFA (35/65/01), isokratisch, 5 µl/min, λ = 230 nm. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 dargestellt.

15 Die Differenz zwischen Hauptversuch und Blindprobe ist CRC 220 als aktive chemische Verbindung. Da Clonidin-HCl (4,6 min) weder im Hauptversuch noch in der Blindprobe auftritt, wird es nicht vom Target, sondern vom Filter gebunden. Es ist kein Inhibitor.

20 Beispiel 2: Bindung nicht equimolarer Gemische von Amidinophenylalaminen unterschiedlicher Bindungsstärke an Trypsin.

Es wurden die im folgenden durch ihre Strukturformeln wiedergegebenen Trypsin-Hemmstoffe von 3-Amidinophenylalamin-Typ als chemische Substanzen und die
25 Serinprotease Trypsin als Target verwendet:

Tabelle 3

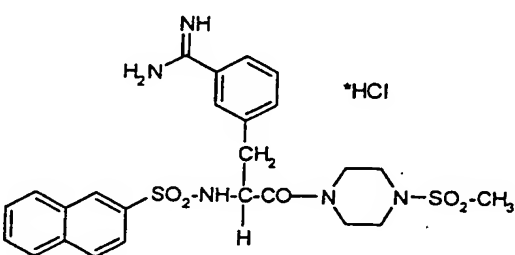
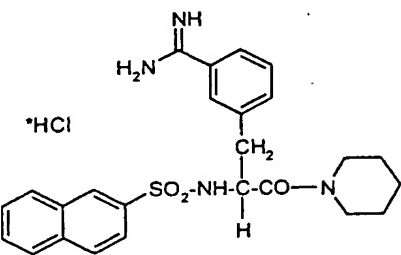
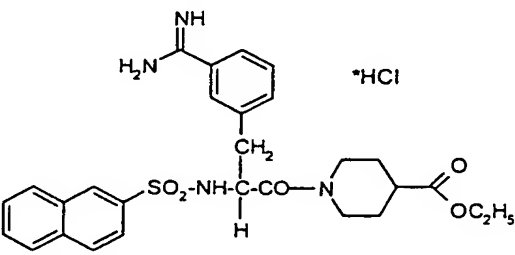
Nr.	Struktur N alpha/P2/ C alpha	Formel	Ki [μmol/l] Thrombin	Ki [μmol/l] Trypsin
6 (120)*HCl	βNas/-/ Pzd-N-SMe		0,0021	0,067
7 (105-95) *HCl	βNas/-/Ppd		0,065	0,33
10 (110-79) *HCl	βNas/-/ iNip-Oet		0,36	0,02

Tabelle 4: Zusammensetzung der Assays

Probe	Trypsin 10.600 E/mg	6 (K _i =67 nM)	7 (K _i =330 nM)	10 (K _i =20 nM)	0,9 % NaCl in Wasser (reinst)
261; 300	0	1,68 nmol 8,4 μmol/l	8,25 nmol 41,25 μmol/l	0,5 nmol 2,5 μmol/l	ad 200 μl
262; 301; 302	10 nmol 50 μmol/l	1,68 nmol 8,4 μmol/l	8,25 nmol 41,25 μmol/l	0,5 nmol 2,5 μmol/l	ad 200 μl

Die Versuche wurden durchgeführt wie in Beispiel 1 beschrieben.

Tabelle 5: Ergebnisse

Probe	Substanz	Filtrat [μmol/l]	1. Waschung [μmol/l]	2. Waschung [μmol/l]	Freisetzung [μmol/l]
261	6	7,44	0,71	0,05	0,01
	7	31,57	3,13	0,26	0,13
	10	0,05	0,02	0,0013	0,0011
262	6	0,67	0,23	0,15	6,09
	7	22,22	3,68	1,29	8,49
	10	0,02	0,0058	0,0012	0,53

Beispiel 3: Isolierung und Identifizierung von Naturstoffen aus Taraxacum-Extrakt

Für die Assays verwendete Substanzen:

- 10 a) Extr. Taraxaci spir. sicc. (Naturstoff-Trockenextrakt der Firma Caelo)
Herstellung von wässrigen Lösungen:
- Suspension der Trockenextrakte in Wasser (0,2 g in 20 ml)
 - 5 min Behandlung im Ultraschallbad, 30 min Stehen unter gelegentlichem Schütteln
 - Filtration durch Membranfilter (0,7 μm), anschliessend durch Anotop 25-Filter (0,02 μm)
 - Prüfung auf Gerbstoffe mittels FeCl₃, Pb(CH₃COO)₄ und Gelatine: negativ

b) β₂-Adrenorezeptor (= Target)

- 20 - Membranpräparation aus Sf9-Insektenzellen, die 3 Tage mit einem rekombinanten β₂-adrenergen-Rezeptor-Baculovirus infiziert worden waren (Zellen und Viren, Plasmidkonstruktion, Isolierung des rekombinanten Baculovirus und Präparation der Membranen: MPI für Biophysik, Abt. für Molekulare Membranbiologie, Frankfurt/Main, Dr. Helmut Reiländer)
- 25 [H. Reiländer, *Febs letters*, 282, 441-444 (1991)]

In den Assays wurden der Taraxacum-Extrakt und die Membranpräparation in unterschiedlichen stöchiometrischen Verhältnissen, gelöst in 200 µl Bindungspuffer (150mM NaCl, 50mM Tris, pH 8,2 in Wasser) kombiniert.

5

Die Rezeptor-Ligand-Bindung wurde vervollständigt durch 30 Minuten lange Inkubation der Mischung bei 30-34 °C. Die Lösungen wurden dann auf ein Microcon 10-Zentrifugalfilter gegeben und bei 9981xg 15 min lang bzw. bis zur Trockenheit des Filters zentrifugiert. Der Vergleich der Chromatogramme der Proben mit (= Hauptversuch) und ohne Rezeptor (= Blindprobe) führte zur Identifizierung der gebundenen chemischen Substanzen. Nach zwei Waschschritten mit Bindungspuffer wurden die auf dem Filter befindlichen Komplexe getrennt durch Behandlung mit 200 µl TFA (1/49,5/49,5).

15 Tabelle 6: Zusammensetzung der Assays:

Probe	β ₂ -adrenerger Rezeptor (Membranpräparation 10/98; 6,5 pmol Rezeptor pro mg Protein)	Extr. Taraxaci (10mg/ml wässriger Extrakt, filtriert durch Anotop 25- Filter (Merck))	Bindungspuff r (150mM NaCl; 50mM Tris; pH 8,2)
351	0	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
355	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 pmol 7,5 nmol/l	ad 200 µl
356	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 pmol 7,5 nmol/l	ad 200 µl
360	0	0,3 mg 1,5 g/l	ad 200 µl
361	1,04 pmol 5,2 nmol/l	0,3 mg 1,5 g/l	ad 200 µl
362	0	0,6 mg 3 g/l	ad 200 µl

363	1,04 pmol 5,2 nmol/l	0,6 mg 3 g/l	ad 200 µl
364	0	1,0 mg 5,0 g/l	ad 200 µl
365	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,0 mg 5,0 g/l	ad 200 µl
366	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
367	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
369	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
373	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
374	0,52 pmol 2,6 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
375	0,26 pmol 1,3 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl

Die Eluate von den folgenden vier Filtrationsschritten wurden im Vakuum bis zur Trockne zentrifugiert und die erhaltenen Substanzen in 10 µl der mobilen Phase der HPLC (vergl. Beispiel 1) kurz vor der LC-Analyse mittels Ultraschall in Lösung gebracht.

5

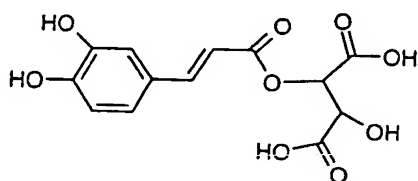
Tabelle 7: Ergebnisse

Probe	Substanz	Filtrat [nmol/l]	1. Waschung [nmol/l]	2. Waschung [nmol/l]	Freisetzung [nmol/l]
351	L3	740,3	51,0	8,0	11,9
	L6	5970,7	15045	750,8	195,0
	L7	3802,1	748,2	145,5	22,7
355	L3	353,5	88,8	12,9	15,8
	L6	1482,0	451,4	100,4	707,0
	L7	1539,6	909,9	180,4	214,5
356	L3	961,9	79,0	9,9	26,3
	L6	1848,6	600,1	202,1	2199,1

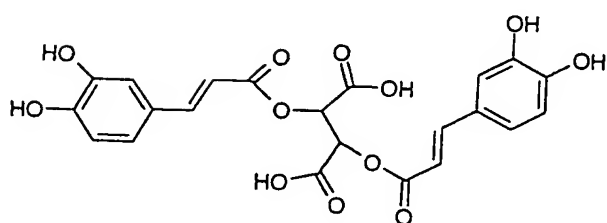
	L7	2183,1	1117,4	295,9	510,7
360	L3	411,5	22,7	0	8,1
	L6	2935,2	468,9	140,3	34,7
	L7	1268,8	129,6	6,6	8,6
361	L3	537,0	16,5	29,6	11,2
	L6	1588,2	146,5	124,3	138,1
	L7	1268,8	129,6	6,6	8,6
362	L3	650,1	20,5	5,6	3,2
	L6	3446,6	958,0	351,4	85,4
	L7	1423,2	176,5	33,7	7,5
363	L3	736,9	54,4	0	8,7
	L6	1180,6	248,3	142,0	257,0
	L7	1740,7	76,4	104,2	16,9
364	L3	1034,4	36,9	3,0	5,3
	L6	3752,4	1377,0	627,8	151,3
	L7	1829,6	92,7	30,1	89,6
365	L3	1221,4	51,7	8,6	9,8
	L6	2291,6	626,7	141,6	436,9
	L7	2746,8	74,0	11,2	111,9
366	L3	2088,5	102,8	2,3	7,6
	L6	5581,8	620,0	181,5	504,8
	L7	4261,6	1425,3	213,1	168,2
367	L3	2310,8	46,2	15,6	6,3
	L6	5159,0	832,5	274,6	616,8
	L7	6243,7	1509,0	199,2	232,9
369	L3	2381,4	90,8	41,8	7,0
	L6	7449,7	478,1	341,9	674,0
	L7	3505,8	986,8	221,7	378,7
373	L3	2450,0	91,7	26,6	36,2
	L6	5562,6	182,7	277,1	2096,1
	L7	4900,2	1176,5	285,4	847,8
374	L3	2593,2	44,0	7,4	25,3
	L6	8589,0	1062,4	476,6	1015,4
	L7	5661,6	627,7	200,9	538,8
375	L3	2252,1	39,7	19,6	19,0
	L6	10838,5	921,1	433,9	279,9
	L7	4921,4	631,3	112,3	154,4

Die drei "gefischten", d. h. durch Komplexbildung und anschliessende Freisetzung aus dem Komplex erhaltenen Liganden (L3 = trans-Caftarinsäure, L6 = trans-Chicorinsäure und L7 = trans-Diferoyl-weinsäureester) konnten mittels UV, ¹H-NMR und MS identifiziert werden.

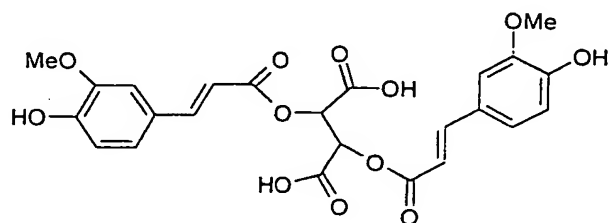
5



L3



L6



L7

Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1 zeigt eine symbolische Darstellung der Bildung des mindestens einen Komplexes. Zu einem Gemisch von 1000 verschiedenen, nicht equimolaren chemisch einheitlichen Substanzen (davon vier aktiven) wird ein Target hinzugefügt. Es entstehen vier verschiedene Komplexe, die jeweils eine der aktiven chemischen Substanz gebunden enthalten. Die 996 inaktiven Substanzen können dann mittels Ultrafiltration von den Komplexen abgetrennt werden. Es bedeuten:

- 1 = Target
- 2 = diverse aktive chemische Substanzen
- 3 = diverse inaktive chemische Substanzen (Punkte)
- 4 = verschiedene Komplexe mit mindestens einer aktiven chemischen Substanz

Die Fig. 2 zeigt:

- 15 A) Gemisch chemischer Substanzen mit Inhibitor CRC 220
Clonidin-HCl (4,6 min), CRC 220 (6,9 min), Bromhexin (12,3 min), Amitryptilin (17,6 min), Chlorpromazin-HCl (23,9 min), Chlorprothixen-HCl (26,9 min)
- B) Filtrat ohne Target [Blindprobe]
- C) Filtrat mit Target Thrombin [Hauptversuch]

20

Die in Fig. 3 enthaltenen Chromatogramme zeigen:

- A) Taraxacum (Blindprobe)
- B) Taraxacum (Hauptversuch)
- C) Taraxacum Freisetzung

25

Die Differenz zwischen Blindprobe und Hauptversuch zeigt, dass ca. 12 Substanzen gebunden sind, während die durch die Freisetzungsmethode nur 3 Substanzen ermittelt werden konnten.

Patentanprüche

- 5 1. Verfahren zur Isolierung und / oder Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus einem Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen, gekennzeichnet durch die Schritte:
- a) Hinzufügen eines Targets zu diesem Gemisch und Bildung eines Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches,
- b) Abtrennung des Komplexes von den inaktiven chemischen Substanzen des Gemisches, und
- entweder
- c) Freisetzung und Isolierung und / oder Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus dem abgetrennten Komplex
- oder
- 15 d) Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches durch Differenzbildung eines Chromatogramms des Gemisches aktiver und inaktiver chemischer Substanzen und eines Chromatogramms des nach Abtrennung des Komplexes erhaltenen Gemisches inaktiver chemischer Substanzen und ggf. Freisetzung und Isolierung der mindestens einen aktiven Substanz aus dem abgetrennten Komplex.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Hinzufügen des Targets zu dem Gemisch von chemischen Substanzen in einer Lösung, einer Suspension oder einer Dispersion erfolgt.
- 25 3. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Hinzufügen in einer wässrigen Lösung erfolgt.
4. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert der wässrigen Lösung mit Hilfe eines geeigneten Puffers stabilisiert wird.
- 30 5. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Komplex durch eine Bindung zwischen der

mindestens einen aktiven chemischen Substanz und dem Target hergestellt wird.

- 5
6. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Bindung um eine kovalente oder nicht-kovalente Bindung handelt.
7. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der nicht-kovalenten Bindung um Wasserstoffbrücken, elektrostatische Wechselwirkungen, Metallkomplexierung, Wechselwirkungen von lipophilen Gruppen der aktiven chemischen Substanz mit dem Target, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder um Kation- π -Wechselwirkungen handelt.
- 15
8. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Abtrennung des Komplexes von den inaktiven chemischen Substanz mittels Ultrafiltration, Ultrazentrifugation oder anderer geeigneter Methoden erfolgt.
- 20
9. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Isolierung und / oder Identifizierung der mindestens einen aktiven chemischen Substanz des abgetrennten Komplexes mit Methoden wie HPLC, Elektrochromatografie, Elektrophorese, Kopplungstechniken wie LC-MS oder MS-MS, vorzugsweise mittels Mikro-Kapillar- oder Nano-HPLC erfolgt.
- 25
10. Verfahren erfahrung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung der mindestens einen aktiven chemischen Substanz des Gemisches mit Methoden wie HPLC, Elektrochromatografie, Elektrophorese, Kopplungstechniken wie LC-MS oder MS-MS, vorzugsweise mittels Mikro-Kapillar- oder Nano-HPLC erfolgt.
- 30
11. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Abtrennung der mindestens einen aktiven chemischen Substanz aus dem Gemisch mittels präparativer HPLC, Elektrochromatografie oder Elektrophorese erfolgt.

12. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen eine Substanzbibliothek, erhalten aus synthetischer oder kombinatorischer Chemie, oder ein Naturstoffextrakt ist.
- 5 13. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch chemischer Substanzen ein chemisch modifizierter Naturstoffextrakt ist.
14. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch chemischer Substanzen ein Gemisch verschiedener Naturstoffextrakte ist.
15. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen mindestens 50 verschiedene chemische Substanzen enthält.
- 15 16. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Target ein Protein ist.
17. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Target ein Enzym, ein Rezeptor, ein Antikörper, eine biologischen Membran oder eine Zelle ist.
18. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Target das Enzym Thrombin ist.
- 20 19. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Target der Rezeptor Trypsin ist.
20. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Target der β_2 -Adrenozeptor ist.
- 25 21. Vorrichtung zur kombinierten Durchführung des Verfahrens gemäss Anspruch 1.
-

ZUSAMMENFASSUNG

1. Ein Verfahren zur Isolierung und / oder Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus einem Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen ist gekennzeichnet durch die Schritte:

- a) Hinzufügen eines Targets zu diesem Gemisch und Bildung eines Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches,
b) Abtrennung des Komplexes von den inaktiven chemischen Substanzen des Gemisches, und

entweder

- c) Freisetzung und Isolierung und / oder Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus dem abgetrennten Komplex

oder

- d) Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches durch Differenzbildung eines Chromatogramms des Gemisches aktiver und inaktiver chemischer Substanzen und eines Chromatogramms des nach Abtrennung des Komplexes erhaltenen Gemisches inaktiver chemischer Substanzen und ggf. Freisetzung und Isolierung der mindestens einen aktiven Substanz aus dem abgetrennten Komplex.

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Bildung von Komplexen aus Target und aktiven chemischen Substanzen und ihrer Abtrennung von den inaktiven chemischen Substanzen.

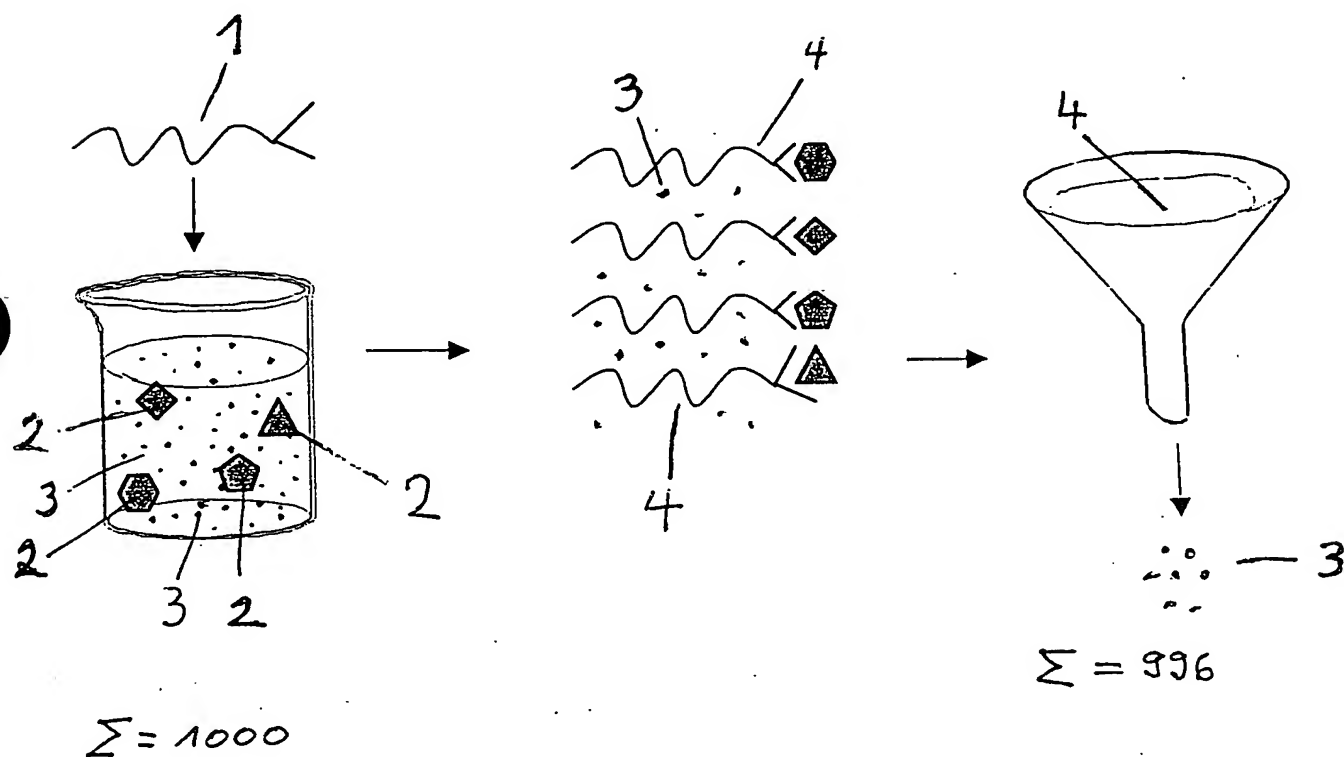


Abbildung 2: Chromatogramme eines Gemisches aktiver und inaktiver chemischer Substanzen, sowie von Hauptversuch und Blindprobe.

A) Gemisch chemischer Substanzen mit Inhibitor CRC 220

Clonidin-HCl (4,6 min), CRC 220 (6,9 min), Bromhexin (12,3 min), Amitriptylin (17,6 min), Chlorpromazin-HCl (23,9 min), Chlorprothixen-HCl (26,9 min)

B) Filtrat ohne Target [Blindprobe]

C) Filtrat mit Target Thrombin [Hauptversuch]

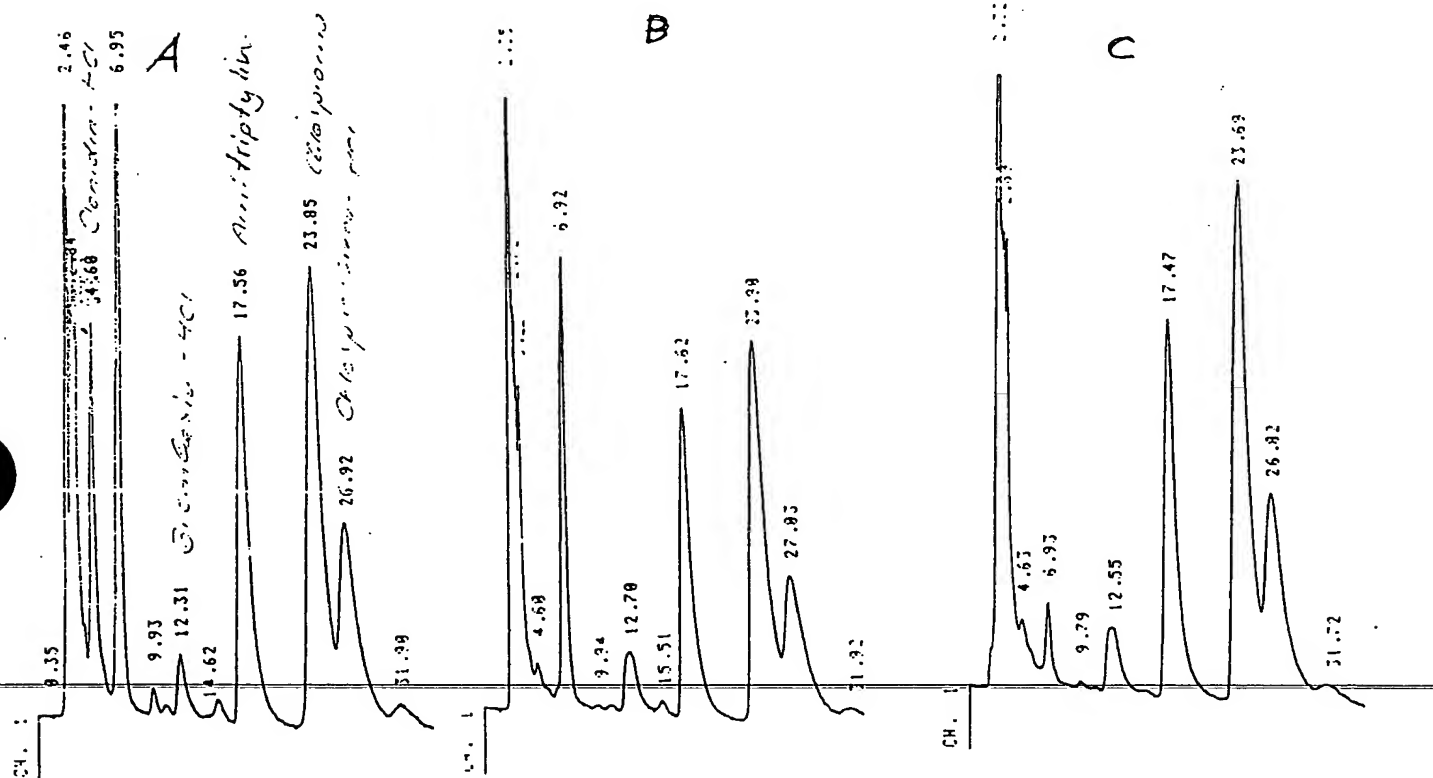
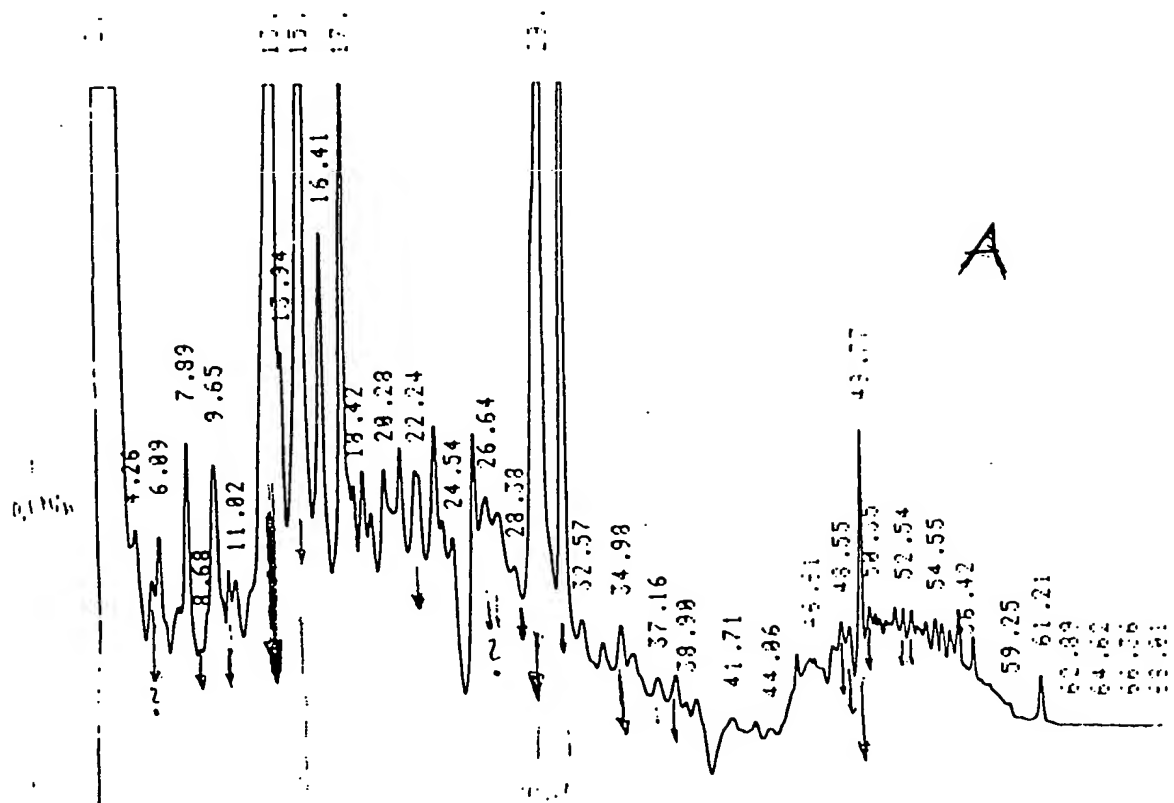
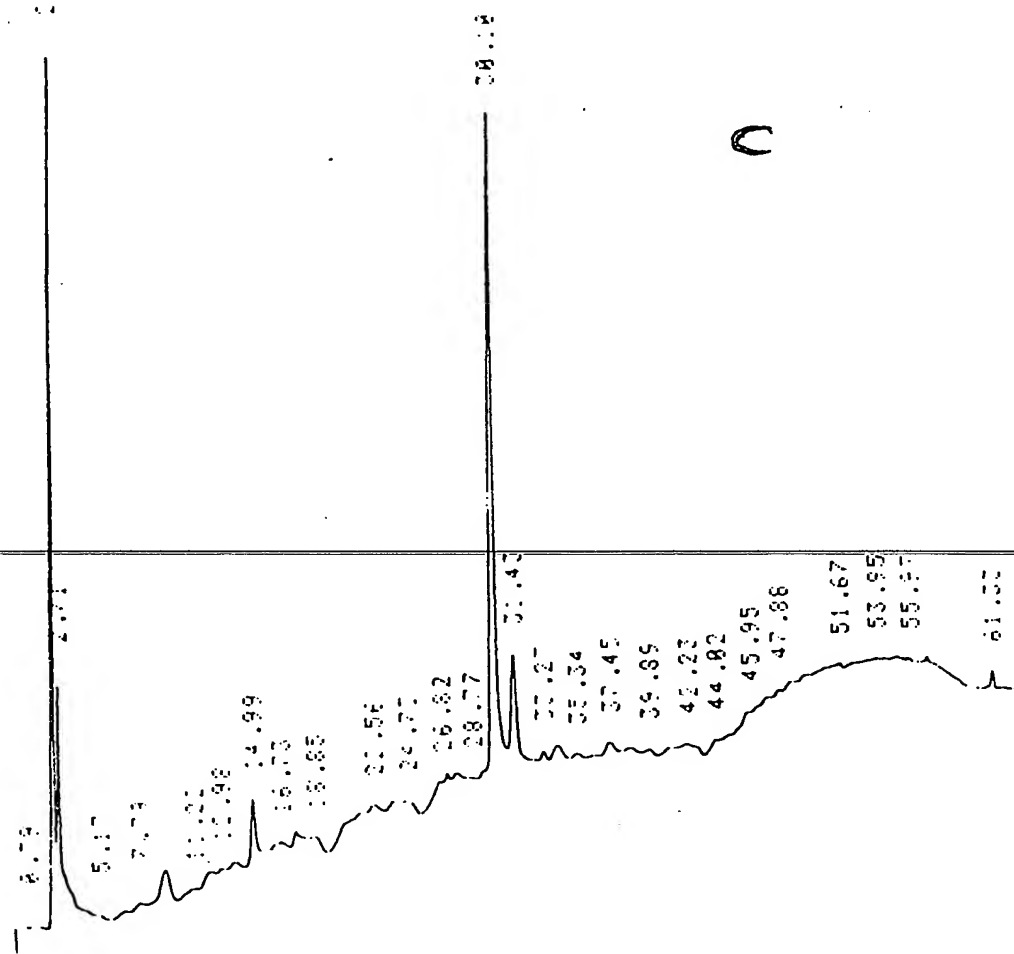
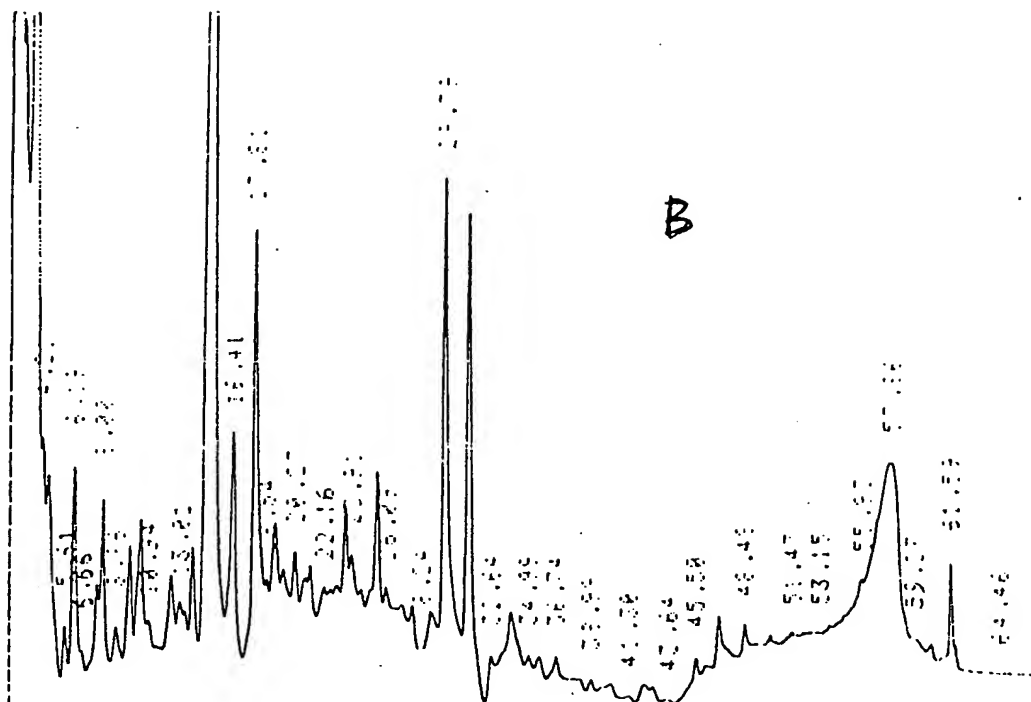


Abbildung 3: Chromatogramme:

- A) Taraxacum (Blindprobe)
- B) Taraxacum (Hauptversuch)
- C) Taraxacum Freisetzung

5





Verfahren zum Auffinden und zur Isolierung pharmakologisch wirksamer Verbindungen aus Substanzgemischen sowie eine Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens.

5 Beschreibung

Die Arzneimittelforschung hat sich, ausgehend von der Nutzung ausschliesslich natürlicher Quellen über die chemische Synthese von Wirkstoffen und deren Prüfung durch Tierversuche zum gezielten computergestützten Strukturdesign von
10 Wirkstoffen mit Hilfe des Einsatzes experimenteller und theoretischer Methoden hin entwickelt.

Mit zunehmender Kenntnis der verschiedenen Krankheitsursachen (z. B. das Fehlen oder die genetisch bedingte Veränderung eines Proteins) ist die
15 Arzneimittelforschung und die Therapie mit Arzneimitteln wesentlich komplexer geworden. So konnten in den vergangenen zehn Jahren mittels molekularbiologischer Methoden (Humanes Genom Projekt) die genetischen Ursachen einiger primär neurodegenerativer Erkrankungen wie des Morbus Alzheimer, des Morbus Parkinson, des Morbus Huntington, der Amyotrophen Lateralsklerose, der Prionkrankheiten und
20 verschiedener ataxischer Syndrome aufgeklärt werden. Dieses Erkennen der den Krankheiten zugrundeliegenden biologischen Veränderungen stellt die Grundlage für einen Wechsel von einer symptomatischen, palliativen hin zu einer kausalen Therapie dar.

25 100 bis 150 der circa 30.000 in der Medizin beschriebenen Krankheiten sind so relevant, dass sie sich als Forschungsprojekte für die Pharmaindustrie eignen. Die derzeit zur Verfügung stehenden Medikamente zielen auf eine therapeutische Beeinflussung von ca. 400 Rezeptoren, Enzymen und anderen Biomolekülen. Man geht jedoch davon aus, dass etwa bis zu 10.000 Gene und deren Produkte als Target
30 für die Wirkstoffforschung in Frage kommen. Der Nachweis ihrer pathologischen Relevanz erfordert unter anderem aussagekräftige molekulare und zelluläre Systeme.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Neben dem rationalen Design, das die Optimierung von Stoffeigenschaften aufgrund von Erfahrungswerten oder basierend auf bekannten molekularen Strukturen einbezieht, spielen derzeit die Kombinatorische Chemie und die in der Entwicklung befindliche Kombinatorische Biosynthese eine grosse Rolle in der
5 Arzneimittelforschung.

Eine bedeutende Schwachstelle dieser Methoden ist die eingeschränkte Diversität synthetischer Substanzen, verglichen mit der strukturellen Komplexität pflanzlicher und mikrobieller Sekundärmetabolite.

10 Um diese natürliche Vielfalt erschliessen zu können, ist eine enge Verknüpfung der klassischen Naturstoffforschung mit der molekularen Medizin und der organischen Chemie unumgänglich. Auf der Suche nach neuen Leitstrukturen erfolgt die Auswahl pflanzlicher und tierischer Organismen sowie der Pilze und Mikroorganismen nach
15 dem Zufallsprinzip, unter chemotaxonomischen Gesichtspunkten, aufgrund ökologischer Beobachtungen und aufgrund ethnomedizinischer Vorkenntnisse.

Das Auffinden einer oder mehrerer wirksamer Komponente(n) aus Substanzgemischen wie z. B. aus durch Kombinatorische Chemie erstellten
20 Substanzbibliotheken oder aus Naturstoffextrakten ist jedoch sehr aufwendig.

Naturstoffextrakte z. B. bestehen im allgemeinen aus einer Vielzahl (bis zu 2.000) unterschiedlichster, den gesamten Polaritätsbereich umfassenden Substanzen, was durch verschiedenartige Grundstrukturen und funktionelle Gruppen bedingt ist. In der
25 Regel machen hier nur relativ wenige Verbindungen bereits ca. 80 % des Extraktgewichtes aus, während die Überzahl der restlichen Verbindungen jedoch in geringer Konzentration bis hin zum ppm-Bereich, also nicht-equimolar vorliegen. Häufig zeigen in einem solchen Extrakt aber nur wenige oder sogar nur eine einzige Substanz die charakteristische biologische Aktivität, wobei diese Aktivität auf eine im
30 Extrakt in Spuren vorliegende Substanz zurückzuführen sein kann.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Bisher erfolgt das Aufarbeiten und Analysieren der meist chromatografisch getrennten Inhaltsstoffe eines natürlichen Extrakts oder einer mittels Kombinatorischer Chemie hergestellten umfangreichen Substanzbibliothek in der Regel unter Anwendung von automatisierten Testsystemen mit extrem hohem Durchsatz (High-throughput Screening; HTS). Dieses Verfahren ist jedoch sehr aufwendig und kostenintensiv. So ist es erforderlich, aus der Naturstoffquelle (z. B. Pflanze, Tier, Pilz, Mikroorganismus) zunächst selektive Extrakte mit Lösungsmitteln steigender Polarität herzustellen und diese biologisch zu testen. Weitere Tests erfolgen nach der Bildung von Unterfraktionen aus dem jeweils wirksamen selektiven Extrakt.

Schliesslich muss ein letzter Test zeigen, welche Reinsubstanz(en) nach Isolierung aus der wirksamen Fraktion biologische Aktivität zeigen und somit einen "Hit" darstellen. Für die chromatografische Auftrennung in Unterbibliotheken und deren Testung werden jeweils mehrere Wochen benötigt. Um ausreichende Mengen der Reinsubstanz(en) gewinnen zu können, muss daher der Start mit grossen Extraktmengen erfolgen. Auch dies ist verbunden mit hohen Kosten für präparative HPLC-Säulen und den hohen Lösungsmittelbedarf (sowohl Anschaffung als auch Entsorgung).

Bereits durch die Auftrennung in Unterfraktionen, aber erst recht durch die Isolierung der reinen Naturstoffe gehen eventuell vorhandene synergistische oder antagonisierende Effekte der einzelnen Komponenten des Extraktes im Hochdurchsatz-Screening verloren. So kann ein im ersten Test wirksamer Extrakt seine biologische Wirksamkeit einbüssen, weil das Auftrennen zu einzelnen Substanzen eine Targetbindung, die nur im Zusammenspiel verschiedener Komponenten möglich war, verhindert.

Ein Verfahren zum Auffinden wirksamer Komponenten aus einer synthetischen, durch Kombinatorische Chemie erstellten Peptidbibliothek, die aus maximal 19 chemisch sehr ähnlichen, sich nur durch Austausch von Aminosäuren ergebenden und in equimolaren Mengen vorliegenden Peptiden besteht, wird von Zuckermann et

THIS PAGE BLANK (USPTO)

al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 4505-4509 (1992) beschrieben. Dazu wurde ein Antikörper im Überschuss zu einer solchen Peptid-Substanzbibliothek gegeben und der Target (=Antikörper)-Peptid-Komplex durch schnelle Gelfiltration abgetrennt. Das Peptid wird aus dem Komplex mit 1% Trifluoressigsäure freigesetzt und die Struktur durch Massenspektroskopie und Aminosäureanalyse aufgeklärt. Dieses Verfahren eignet sich aber nicht zur Isolierung von Target-Molekül-Komplexen kleinerer Moleküle (Molekulargewicht kleiner oder gleich 1500), da die Gelfiltration nur mit grösseren Molekulargewichtsunterschieden technisch funktioniert. Auch erfordert es nach Aussage der Autoren equimolare Mischungen. Weiterhin ist die Ermittlung synergistisch wirkender Kombinationen von Liganden unmöglich bzw. dem Zufall überlassen.

Auch die von Wieboldt et al. in *Anal. Chem.*, 69, 1683-1691 (1997) beschriebenen Experimente sind ebenfalls auf equimolare Gemische von 20 bis 30 eng verwandte Moleküle (synthetisch hergestellte Derivate mit einer allgemeinen 1,4-Benzodiazepin-Struktur) gerichtet. Die eingeschränkte Diversität der synthetischen Substanzen erleichtert zwar die experimentelle Bearbeitung, stellt aber zugleich einen begrenzenden Faktor für ihre Anwendbarkeit dar.

Ebenso benötigt die von R. B. van Breemen et al. in *Anal. Chem.*, 69, 2159-2164 (1997) beschriebene gepulste Ultrafiltration Massenspektrometrie eine equimolare Substanzbibliothek mit 20 Substanzen. Da nur mit organischen Lösemitteln freigesetzt wird, können kovalent gebundene Substanzen nicht entdeckt werden.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher die Entwicklung einer schnell durchführbaren und effizienten Methode zum Auffinden und zur Isolierung von biologisch, z. B. pharmakologisch aktiven chemischen Substanzen und Substanzkombinationen, insbesondere aus nicht equimolaren Gemischen wie Naturstoffextrakten (z. B. aus Pflanze, Tier, Pilz, Mikroorganismus).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, das durch folgende Schritte gekennzeichnet ist:

- a) Hinzufügen eines Targets zu einem Gemisch von chemischen Substanzen, z. B. einem Naturstoffextrakt,
- 5 b) Bildung mindestens eines Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz, wobei diese chemische Substanz an das Target gebunden wird,
- c) Abtrennung der nicht gebundenen chemischen Substanzen des Gemisches von dem mindestens einen Komplex und ggf. deren analytische (z. B. chromatografische) Erfassung (= Hauptversuch).
- 10

Die in einem separaten Versuch ohne Target (Blindprobe) zu ermittelnden, zusätzlich oder in höheren Konzentrationen auftretenden Substanzen stellen die Summe aller vom Target gebundenen Substanzen dar. Diese werden isoliert und strukturell aufgeklärt.

15

Als weitere Schritte zur Aufarbeitung des Komplexes können aber auch die:

- d) Freisetzung der im Komplex an das Target gebundenen mindestens einen aktiven chemischen Substanz unter Zerstörung der Bindung zwischen aktiver chemischer Substanz und dem Target im Komplex, die
- 20 e) Abtrennung der mindestens einen freigesetzten aktiven chemischen Substanz und die
- f) Identifizierung der mindestens einen abgetrennten aktiven chemischen Substanz und ggf. der Vergleich mit den im Schritt c) identifizierten Substanz(en)
- 25

in Frage kommen.

Unter einem biologischen Target versteht man ein Protein (z. B. Rezeptor, Enzym, Antikörper), eine biologische Membran oder eine ganze (gesunde oder Krebs-)Zelle. Bei Kontakt, insbesondere bei Bindung zwischen einer passenden aktiven chemischen Substanz mit diesem Target kann die Auslösung einer Reaktion erfolgen,

30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

die für das Target charakteristisch ist und meist mit einem biochemischen Prozess in Verbindung steht. Mit anderen Worten: Die aktive chemische Substanz besitzt eine starke Affinität zu dem speziellen Target. Beispiele für solche Targets sind die Proteine Thrombin, Trypsin und der β_2 -Adrenorezeptor.

5

Als "chemische Substanz" kommen praktisch alle aus der organischen und Naturstoffchemie bekannten, einheitlichen Stoffe in Frage. Hierzu zählen niedermolekulare und hochmolekulare chemische Stoffe, nicht jedoch Polymere aus einer unbekannten Zahl von Monomereinheiten. Dem Fachmann sind solche chemisch einheitlichen Stoffe der organischen Chemie bekannt. Hierzu zählen aliphatische, aromatische und cyclische Kohlenwasserstoffe und Verbindungen mit funktionellen Gruppen, wie Carbonsäuren, Alkohole, Ester, Aldehyde, Lactone, Amide, Heterocyclen, Isoprenoide, Terpene, Kohlenhydrate, Steroide etc. Auch Glykoside, Peptide, Proteine und Enzyme können als eine geeignete chemische Substanz in Frage kommen.

10

15

20

25

Die Molekülmassen geeigneter chemisch einheitlicher Substanzen liegen im allgemeinen oberhalb von $M_r = 150$. So besitzen beispielsweise die bekannten Neurotransmitter Acetylcholin $[H_3CCO-O-CH_2-CH_2-N(CH_3)_3]OH$ und Nicotin Molekülmassen von $M_r = 163$ bzw. $M_r = 162$ und beschreiben somit praktisch die Untergrenze der Molekülmasse der geeigneten chemischen Substanzen. Die Obergrenze der Molekülmasse ist prinzipiell nicht beschränkt. So sind hochmolekulare Proteine (M_r bis etwa 300.000) aufgrund ihrer spezifischen Reaktion mit ganz speziellen biologischen Targets durchaus interessante aktive chemisch einheitliche Substanzen, die durch das erfindungsgemäße Verfahren aus einem Gemisch verschiedener chemischer Substanzen abgetrennt werden können.

30

Uneinheitliche Biopolymere wie z. B. Glykogen, Cellulose etc. kommen für das erfindungsgemäße Verfahren nicht in Frage kommen, weil sie wegen einer undefinierten Zahl von Monomereinheiten keine chemisch einheitlichen Substanzen im Sinne der vorliegenden Erfindung darstellen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Bei den chemischen Substanzen ist weiterhin zwischen aktiven und inaktiven chemischen Substanzen zu unterscheiden. Unter einer aktiven chemischen Substanz ist eine solche zu verstehen, die befähigt ist, bei Bindung zu einem speziellen Target eine dafür charakteristische Reaktion auszulösen. Eine aktive chemische Substanz ist dadurch charakterisiert, dass sie eine Affinität zum Target besitzt. Eine inaktive chemische Substanz braucht keine Affinität zum Target zu besitzen.

Eine echte Obergrenze der Molmasse der in Frage kommenden chemischen Substanz kann daher nicht beziffert werden. Vielmehr wird nur die Einfachheit der Aufarbeitung im wesentlichen durch das Verhältnis der Molmasse der aktiven chemischen Substanz zur Molmasse des Targets festgelegt. Die Molmasse dieses Targets ist im allgemeinen sehr hoch, und kann z. B. oberhalb von 1 Million liegen. Wie gesagt kann das Target auch eine ganze Zelle sein. Chemische Substanzen mit kleiner Molmasse (etwa 150 bis etwa 30.000) sind von solchen Targets aufgrund der grossen Massendifferenz leicht durch konventionelle Verfahren wie Ultrazentrifugation abzutrennen. Wenn aber die Molmasse der aktiven chemischen Substanz und die Molmasse des Targets in vergleichbaren Grössenordnungen liegen, liefert auch die Ultrazentrifugation nur noch unbefriedigende Trennergebnisse und man muss anspruchsvollere oder zusätzliche Trennverfahren anwenden.

Unter einem "Gemisch von chemischen Substanzen" ist eine Mischung von verschiedenen chemischen Substanzen zu verstehen, die mindestens eine aktive chemische Substanz enthält, die das oben genannte Kriterium erfüllt, d. h. die eine Reaktion bei Kontakt an einem speziellen Target auszulösen vermag. Das Gemisch kann auch mehrere solcher aktiver chemischer Substanzen enthalten. Weiterhin kann das Gemisch auch chemische Substanzen enthalten, die keine Reaktion an einem biologischen Target auszulösen vermögen. In der Regel stellen die inaktiven chemischen Substanzen den Hauptanteil in dem Gemisch verschiedener chemischer Substanzen dar. Insbesondere sind die im Gemisch von chemischen Substanzen enthaltenen inaktiven chemischen Stoffe nur in Bezug auf ein speziell ausgewähltes

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Target inaktiv, sind aber durchaus in der Lage, an einem anderen Target eine solche Reaktion auszulösen.

In der Praxis handelt es sich bei dem Gemisch chemischer Substanzen bevorzugt um Substanzbibliotheken, die synthetisch oder mit Hilfe der Kombinatorischen Chemie hergestellt werden oder um einen Naturstoffextrakt. Unter einem Naturstoffextrakt im Sinne dieser Definition sind somit komplexe Gemische chemisch einheitlicher Substanzen zu verstehen, die aus einer biologischen Quelle stammen und vorzugsweise aus Pflanzen, Pflanzenteilen wie Blättern, Blüten, Holz, Wurzeln, Rinde etc., Pilzen, Tieren, Drüsen, Eiern und Exkrementen von Tieren, Mikroorganismen etc. gewonnen werden. Dies geschieht durch bekannte Verfahren, z. B. Wasserdampfdestillation, trockene Destillation, Extraktion mit Wasser, organischen, anorganischen oder überkritischen Lösungsmitteln; häufig auch unter gleichzeitiger bzw. anschließender chemischer Weiterverarbeitung wie Veresterung, Verseifung, Salzbildung, Hydrierung, Dehydratation, Isomerisierungen, Alkylierungen, Fermentation, enzymatischer Abbau etc. Die so gewonnenen Naturstoffextrakte entsprechen also, was die Zusammensetzung ihrer Inhaltsstoffe anbetrifft, mitunter nicht mehr der in der biologischen Quelle vorliegenden Zusammensetzung. Im allgemeinen sind aber eine Vielzahl, d. h. mindestens 50 unterschiedlichster chemischer Substanzen vorhanden, darunter – wie bereits gesagt – zahlreiche nur in Spuren, d. h. in einer Konzentration von nur einigen ppm. Häufig zeigen in einem solchen Extrakt aber nur wenige oder sogar nur eine einzige Substanz die charakteristische biologische Aktivität, wobei diese Aktivität auf eine im Extrakt nur in Spuren vorliegende Substanz zurückzuführen sein kann. Das Gemisch chemischer Substanzen kann auch ein Gemisch verschiedener Naturstoffextrakte sein. Im konkreten Beispiel wurde ein Extrakt aus Löwenzahn (*Taraxacum officinale*) gewählt. Besonders wichtige biologische Quellen stellen natürlich die Heilpflanzen dar, deren Extrakte physiologische und / oder pharmakologische Wirkungen besitzen und zum Teil im DAB und HAB genannt werden.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Das "Hinzufügen" des Targets zu dem Gemisch von chemischen Substanzen erfolgt vorzugweise in Lösung, Suspension oder Dispersion. In vielen Fällen kann das Hinzufügen in einer wässrigen Lösung, insbesondere in einer, deren pH-Wert mit Hilfe eines geeigneten Puffers stabilisiert wird, erfolgen. Es ist ein besonderer Vorteil der hier beschriebenen Methode, dass eine vorangehende Auftrennung des Gemisches von chemischen Substanzen in mehrere verschiedene Fraktionen bis zu reinen chemischen Substanzen vor dem Hinzufügen des Targets nicht erfolgt.

Mit einem "Komplex" ist ein isolierbares Teilchen gemeint, welches aus dem Target besteht, an das mindestens eine aktive chemische Substanz gebunden ist. Ein Target kann auch zwei oder mehrere aktive chemische Substanzen an sich binden. Die in einem solchen Komplex an das Target gebundenen zwei oder mehr aktiven chemischen Substanzen können in einem bestimmten, charakteristischen Verhältnis zueinander vorliegen, welches hinsichtlich der spezifischen Reaktion des speziellen Targets einer synergistischen Wirkung entspricht. Der Fachmann spricht wegen der häufigen Konstellation, dass als Target ein Protein gewählt wird, auch von Protein-Ligand-Komplexen.

Im Komplex ist die mindestens eine aktive chemische Substanz an das Target "gebunden". Dabei spielt die Art der Bindung zwischen Target und der oder den aktiven chemischen Substanz(en) grundsätzlich keine Rolle. Am häufigsten treten kovalente oder nicht-kovalente Bindungen auf. Zu letzteren zählen z. B. Wasserstoffbrücken, elektrostatische Wechselwirkungen, z. B. zwischen entgegengesetzt geladenen Gruppen, Metallkomplexierung, Wechselwirkungen von lipophilen Gruppen der aktiven chemischen Substanz mit hydrophoben Bereichen (sog. Taschen) des Targets, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und Kation- π -Wechselwirkungen. Es ist auch oft die Kombination verschiedener Wechselwirkungen, die die Affinität einer aktiven chemischen Substanz zum Target verursachen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Die "Abtrennung" des mindestens einen Komplexes von den nicht gebundenen, d. h. den "freien" inaktiven chemischen Substanzen des Gemisches erfolgt grundsätzlich mit üblichen Methoden, wobei besonders vorteilhaft Verfahren ohne thermische Belastung des Komplexes gewählt werden. Dazu zählen Filtration, Ultrafiltration, Zentrifugation, Ultrazentrifugation, Gleichgewichtsdialyse, Gelfiltration oder Präzipitation des Komplexes. Die Identifizierung der mindestens einen an das Target gebundenen "aktiven" chemischen Substanz kann mitunter vor der Freisetzung dieser chemischen Substanz aus dem Komplex, z. B. mit Flugzeitmassenspektroskopie (MALDI-TOF) erfolgen.

Die Filtration stellt eine besonders schnelle, einfache und effiziente Separationsmethode dar. Sie kann als Ultrafiltration (z. B. unter Anwendung von Microcon-Filtereinheiten der Firma Amicon) oder mit speziellen Filtrationsgeräten (z. B. Brandel-Zellsammler) durchgeführt werden.

Die "Freisetzung" der mindestens einen aktiven chemischen Substanz aus dem Komplex erleichtert jedoch ihr Auffinden, Isolieren und insbesondere ihre chemische Charakterisierung. Sie schliesst sich dem Trennungsschritt nach zwei oder mehr Waschgängen zur Entfernung unspezifisch adsorbierter Substanzen an. Es wird dadurch die Freisetzung der gebundenen aktiven chemischen Substanzen aus dem Komplex erzielt. Dabei wird die Bindung, die im Komplex zwischen Target und der mindestens einen aktiven chemischen Substanz besteht, wieder gelöst. Man verwendet dazu – abhängig von der Natur der Bindung – physikalische oder chemische Methoden. Das kann z. B. mittels einer sauren, wässrig-niederalkanolischen Lösung, bevorzugt mit einem Gemisch von Trifluoressigsäure/ Methanol/Wasser, z. B. der Zusammensetzung 1/49,5/49,5 (Vol.-%), erfolgen.

Man kann auf den Freisetzungsschritt verzichten, wenn eine Identifizierung der aktiven chemischen Substanz nicht erforderlich ist bzw. wenn der Komplex als solcher identifiziert wird. Man muss auf die Freisetzung verzichten, wenn sich die aktive Substanz durch die Freisetzungsbedingungen verändert werden würde oder sich

THIS PAGE BLANK (USPTO)

nicht durch die Freisetzungslösung abtrennen lässt. Dies ist hauptsächlich bei einigen kovalenten Bindungen der Fall. In diesen Fällen erfolgt die Identifizierung der aktiven chemischen Substanz aus der Differenz der Filtrate mit Target (= Hauptversuch) und ohne Target (Blindprobe). Dieses Verfahren erlaubt es, alle vom Target gebundenen chemischen Substanzen gleichzeitig zu erfassen, während die Freisetzung in der Regel nur wenige (z. B. eins bis drei) aktive chemische Substanzen ergibt, wobei man zudem nicht sicher sein kann, dass sie unverändert sind.

Die in der Blindprobe zusätzlich oder in höherer Konzentration auftretenden Substanzen stellen die potentiell aktiven chemischen Substanzen dar. Sie können mit einer beliebigen Trennmethode (z. B. chromatografisch) auch in grösseren Mengen aus dem Gemisch chemischer Substanzen (z. B. dem Naturstoffextrakt) isoliert werden.

Die "Abtrennung" der mindestens einen freigesetzten aktiven chemischen Substanz von dem Target nach Zerstörung der im Komplex bestehenden Bindung kann mit denselben, grundsätzlich bekannten Methoden erfolgen, die bereits genannt wurden. Auch hier werden bevorzugt die einfachsten und zweckmässigsten Methoden angewandt, d. h. Filtration und Zentrifugation. Die Abtrennung der aktiven chemischen Substanz(en) kann auch mittels präparativer HPLC erfolgen.

Die "Identifizierung" der in der Blindprobe zusätzlich oder in höherer Konzentration auftretenden Substanzen und der mindestens einen abgetrennten aktiven chemischen Substanz erfolgt durch übliche Methoden, wie HPLC, z. B. konventionelle analytische HPLC, Micro-HPLC, Kapillar-HPLC oder Nano-HPLC, oder durch Elektrochromatografie, Elektrophorese oder Kopplungstechniken von LC-MS oder MS-MS. Die Identifizierung der aktiven chemischen Substanz(en) mittels der genannten Methoden kann allerdings auch bereits vor ihrer Freisetzung aus dem Komplex erfolgen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Das erfindungsgemässe Verfahren unterscheidet sich grundsätzlich vom bekannten Hochdurchsatz-Screening, und zwar im wesentlichen dadurch, dass durch das gezielte Bilden eines Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz und dem nachfolgenden Abtrennen der nichtgebundenen inaktiven chemischen Substanzen (Hauptversuch) und der Differenz zur Blindprobe mittels dieses geeigneten speziellen Targets eine einzige oder einige wenige aktive chemische Substanz(en), die sich an das entsprechende Protein binden (sog. "Liganden"), aus einer Substanzbibliothek oder aus einem komplexen Naturstoffgemisch isoliert und identifiziert werden können.

Anstatt jede potentiell interessante chemische Substanz einzeln zu isolieren und dem Target zuzuführen, präsentiert man dieses dem Substanzgemisch. Die sich nach Erkennung entsprechend Emil Fischers "Schlüssel-Schloss-Prinzip" bildenden Komplexe werden z. B. durch Ultrafiltration von den ungebundenen niedermolekularen chemischen Substanzen abgetrennt und durch vergleichende Chromatografie (targetfreie [= Blindprobe] versus targethaltige [= Hauptversuch] Probe) identifiziert. Aus den Komplexen werden dann zur Bestätigung der Ergebnisse die Liganden (die aktiven chemischen Substanzen) zusätzlich freigesetzt – soweit diese stabil und freisetzbar sind –, durch übliche Methoden identifiziert, isoliert und mit den gängigen Methoden der Analytik strukturell aufgeklärt.

Das erfindungsgemässe Verfahren erfordert weder grosse Protein- noch Extraktmengen, benötigt durch Downscaling auf Mikromethoden in der Analytik geringe Lösungsmittelvolumina, erfordert keine zeitintensive Unterfraktionierung, und ermöglicht die Entdeckung synergistisch wirkender Substanzkombinationen. Auf Radioaktiv- und Fluoreszenzmarkierungen kann verzichtet werden. Das erfindungsgemässe Verfahren ermöglicht natürlich auch die Aufarbeitung grösserer Extraktmengen, wobei aktive chemische Substanzen "gefischt" werden können, deren Eigenschaften für die Weiterverwendung dieses Extraktes unerwünscht sind.

THIS PAGE RI ANK (ISPTO)

Besonders vorteilhaft kann das Verfahren eingesetzt werden, wenn aus grösseren Mengen solcher Extrakte nur die aktiven chemischen Substanzen "gefischt" werden sollen, die eine Wechselwirkung mit dem betreffenden Target zeigen. Die mindestens eine abgetrennte aktive chemische Substanz kann dann anstelle des

5 Naturstoffgemisches als wirksames Prinzip eines Arzneimittels weiterverwendet werden. Dies ist auch dann von Bedeutung, wenn mehr als eine aktive chemische Substanz des Naturstoffextraktes mit dem Target einen Komplex bildet und das relative Verhältnis der mehr als einen aktiven chemischen Substanz zueinander für die biologische Wirksamkeit des Naturstoffextrakts eine dominierende Rolle spielt
10 (Synergieeffekt).

Ein Vorteil dieses Verfahrens liegt somit auch in der Möglichkeit zur Identifizierung von wirksamen (synergistischen) Substanzkombinationen, die beim Hochdurchsatz-Screening von Einzelsubstanzen nicht zugänglich sind.

15 Schliesslich konnte mit Hilfe dieses Verfahrens auch die Erkennungsgrenze (Nachweisgrenze) für aktive chemische Substanzen wider Erwarten in den mikromolaren K_i -Wert-Bereich hinein verschoben werden; d. h. Komplexe aus einem Target und einer aktiven chemischen Substanz mit einem K_i -Wert von 1,7 μ M waren
20 nachweisbar.

Die folgenden Beispiele dienen der anschaulichen Darstellung des erfindungsgemässen Verfahrens.

25 Beispiel 1: Isolierung eines Thrombinhemmstoffes vom 4-Amidinophenylalanin-Typ aus einer willkürlich ausgewählten Substanzbibliothek.

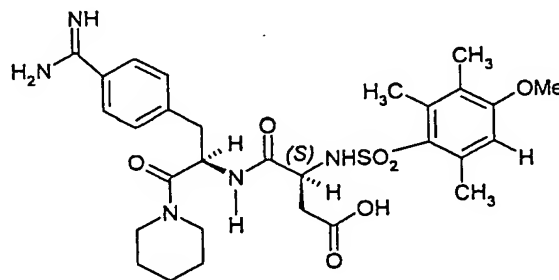
Als Target wurde die Serinprotease Thrombin gewählt. Als Substanzen der Substanzbibliothek (des Gemisches "inaktiver" chemischer Substanzen im Sinne der
30 vorigen Definition) wurden die folgenden fünf Arzneistoffe ausgewählt und zwar

THIS PAGE BLANK (USPTO)

unter Berücksichtigung ihrer Wasserlöslichkeit, ihrer Absorptionsmaxima und ihrer chromatografischen Trennbarkeit:

1. der zentral angreifende α_2 -Adrenorezeptor-Agonist Clonidin-HCl
2. das Mucolytikum Bromhexin-HCl
- 5 3. das tricyclische Antidepressivum Amitryptilin-HCl
4. das Neuroleptikum vom Phenothiazin-Typ Chlorpromazin-HCl
5. das Neuroleptikum vom Phenothiazin-Typ Chlorprotixen-HCl

Als Thrombinhemmstoff (die aktive chemische Substanz) wurde die Verbindung
10 CRC 220 der Behringwerke (Marburg, $K_i = 2,5 \text{ nM}$) mit der folgenden Strukturformel
verwendet:



THIS PAGE BLANK (USPTO)

Die untersuchten Assays hatten folgende Zusammensetzung:

Tabelle 1

Probe	Blindprobe ohne Thrombin	Hauptversuch mit Thrombin
Thrombin 2000 E/mg	0	1 nmol 5 µmol/l
Clonidin-HCl	2 nmol 10 µmol/l	2 nmol 10 µmol/l
Bromhexin-HCl	2 nmol 10 µmol/l	2 nmol 10 µmol/l
Amitriptylin HCl	2 nmol 10 µmol/l	2 nmol 10 µmol/l
Chlorpromazin-HCl	2 nmol 10 µmol/l	2 nmol 10 µmol/l
Chlorprothixen-HCl	2 nmol 10 µmol/l	2 nmol 10 µmol/l
CRC 220	2nmol 10 µmol/l	
0,9 % NaCl in Wasser (reinst)	ad 200 µl	ad 200 µl

- 5 Die Inkubation der Substanzbibliothek und des Inhibitors mit Thrombin erfolgte innerhalb 1 Stunde bei Raumtemperatur; Lösungsmittel: 0,9 % NaCl in H₂O. Die Abtrennung der gebildeten Protein-Ligand-Komplexe erfolgte durch Ultrafiltration (zentrifugal). Alle Filtrationsvorgänge bzw. Waschungen wurden bis zur Trockenheit der Filter durchgeführt.

10

Filter: Microcon 10 (Amicon)

Zentrifugationsbedingungen: 9981xg, Raumtemperatur

Waschschritte: 2 x mit je 150 µl 0,9 % NaCl in H₂O, 4 °C

- 15 Nach der Ultrafiltration und Analyse des Filtrats folgten Waschschritte und die Freisetzung des Liganden (der aktiven chemischen Substanz) aus dem auf dem

THIS PAGE BLANK (ISPTO)

Filter verbliebenen Protein-Ligand-Komplex durch Behandlung mit 200 µl Wasser/Methanol/TFA (49,5/49,5/1) bei Raumtemperatur.

Die Blindprobe (ohne Thrombin) wurde in allen Schritten analog behandelt, so dass ein Vergleich der Filtrate möglich ist. Die bei allen Schritten erhaltenen Filtrate wurden mittels Speed-VAC Concentrator getrocknet und später im entsprechenden HPLC-Fliessmittel definierter Menge unter Anwendung von Ultraschall und Schütteln gelöst.

Die Identifizierung der Liganden erfolgte durch analytische HPLC: stationäre Phase Hypersil C 18 BDS, 3 µm, 150 * 0,3mm, Fusica (LC Packings) – mobile Phase: Acetonitril/Wasser/TFA (35/65/01), isokratisch, 5 µl/min, λ = 230 nm. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 dargestellt.

Die Differenz zwischen Hauptversuch und Blindprobe ist CRC 220 als aktive chemische Verbindung. Da Clonidin-HCl (4,6 min) weder im Hauptversuch noch in der Blindprobe auftritt, wird es nicht vom Target, sondern vom Filter gebunden. Es ist kein Inhibitor.

Beispiel 2: Bindung nicht equimolarer Gemische von Amidinophenylalaminen unterschiedlicher Bindungsstärke an Trypsin.

Es wurden die im folgenden durch ihre Strukturformeln wiedergegebenen Trypsin-Hemmstoffe von 3-Amidinophenylalamin-Typ als chemische Substanzen und die Serinprotease Trypsin als Target verwendet:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Tabelle 3

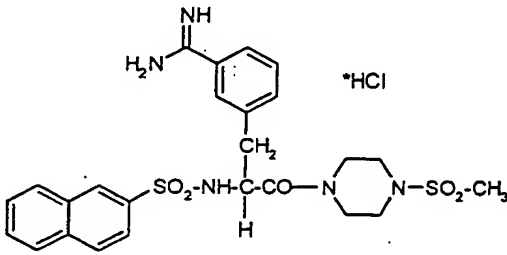
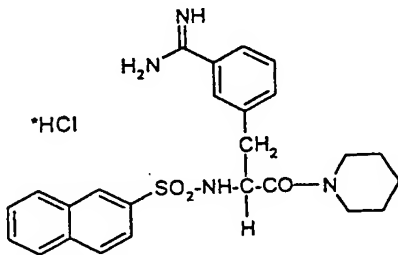
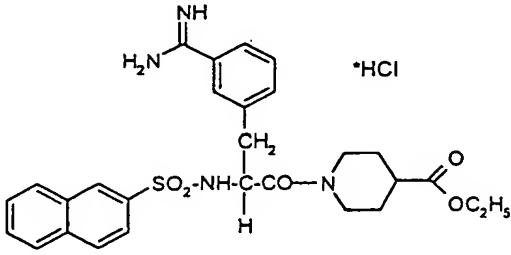
Nr.	Struktur N alpha/P2/ C alpha	Formel	Ki [μM I/I]	Ki [$\mu\text{mol/l}$]
6 (120)*HCl	$\beta\text{Nas/-/}$ Pzd-N-SMe		0,0021	0,067
7 (105-95) *HCl	$\beta\text{Nas/-/Ppd}$		0,065	0,33
10 (110-79) *HCl	$\beta\text{Nas/-/}$ iNip-Oet		0,36	0,02

Tabelle 4: Zusammensetzung der Assays

Probe	Trypsin 10.600 E/mg	6 ($K_i=67\text{ nM}$)	7 ($K_i=330\text{ nM}$)	10 ($K_i=20\text{ nM}$)	0,9 % NaCl in Wasser (reinst)
261; 300	0	1,68 nmol 8,4 $\mu\text{mol/l}$	8,25 nmol 41,25 $\mu\text{mol/l}$	0,5 nmol 2,5 $\mu\text{mol/l}$	ad 200 μl
262; 301; 302	10 nmol 50 $\mu\text{mol/l}$	1,68 nmol 8,4 $\mu\text{mol/l}$	8,25 nmol 41,25 $\mu\text{mol/l}$	0,5 nmol 2,5 $\mu\text{mol/l}$	ad 200 μl

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Die Versuche wurden durchgeführt wie in Beispiel 1 beschrieben.

Tabelle 5: Ergebnisse

Probe	Substanz	Filtrat [μmol/l]	1. Waschung [μmol/l]	2. Waschung [μmol/l]	Freisetzung [μmol/l]
261	6	7,44	0,71	0,05	0,01
	7	31,57	3,13	0,26	0,13
	10	0,05	0,02	0,0013	0,0011
262	6	0,67	0,23	0,15	6,09
	7	22,22	3,68	1,29	8,49
	10	0,02	0,0058	0,0012	0,53

5

Beispiel 3: Isolierung und Identifizierung von Naturstoffen aus Taraxacum-Extrakt

Für die Assays verwendete Substanzen:

- 10 a) Extr. Taraxaci spir. sicc. (Naturstoff-Trockenextrakt der Firma Caelo)
Herstellung von wässrigen Lösungen:
- Suspension der Trockenextrakte in Wasser (0,2 g in 20 ml)
 - 5 min Behandlung im Ultraschallbad, 30 min Stehen unter gelegentlichem Schütteln
 - 15 - Filtration durch Membranfilter (0,7 μm); anschliessend durch Anotop 25-Filter (0,02 μm)
 - Prüfung auf Gerbstoffe mittels FeCl₃, Pb(CH₃COO)₄ und Gelatine: negativ
- b) β₂-Adrenorezeptor (= Target)
- 20 - Membranpräparation aus Sf9-Insektenzellen, die 3 Tage mit einem rekombinanten β₂-adrenergen-Rezeptor-Baculovirus infiziert worden waren (Zellen und Viren, Plasmidkonstruktion, Isolierung des rekombinanten Baculovirus und Präparation der Membranen: MPI für Biophysik, Abt. für Molekulare Membranbiologie, Frankfurt/Main, Dr. Helmut Reiländer)
 - 25 [H. Reiländer, *Febs letters*, 282, 441-444 (1991)]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

In den Assays wurden der Taraxacum-Extrakt und die Membranpräparation in unterschiedlichen stöchiometrischen Verhältnissen, gelöst in 200 µl Bindungspuffer (150mM NaCl, 50mM Tris, pH 8,2 in Wasser) kombiniert.

5

Die Rezeptor-Ligand-Bindung wurde vervollständigt durch 30 Minuten lange Inkubation der Mischung bei 30-34 °C. Die Lösungen wurden dann auf ein Microcon 10-Zentrifugalfilter gegeben und bei 9981xg 15 min lang bzw. bis zur Trockenheit des Filters zentrifugiert. Der Vergleich der Chromatogramme der Proben mit (= Hauptversuch) und ohne Rezeptor (= Blindprobe) führte zur Identifizierung der gebundenen chemischen Substanzen. Nach zwei Waschschritten mit Bindungspuffer wurden die auf dem Filter befindlichen Komplexe getrennt durch Behandlung mit 200 µl TFA (1/49,5/49,5).

10

15 Tabelle 6: Zusammensetzung der Assays:

Probe	β ₂ -adrenerger Rezeptor (Membranpräparation 10/98; 6,5 pmol Rezeptor pro mg Protein)	Extr. Taraxaci (10mg/ml wässriger Extrakt, filtriert durch Anotop 25- Filter (Merck))	Bindungspuffer (150mM NaCl; 50mM Tris; pH 8,2)
351	0	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
355	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 pmol 7,5 nmol/l	ad 200 µl
356	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 pmol 7,5 nmol/l	ad 200 µl
360	0	0,3 mg 1,5 g/l	ad 200 µl
361	1,04 pmol 5,2 nmol/l	0,3 mg 1,5 g/l	ad 200 µl
362	0	0,6 mg 3 g/l	ad 200 µl

THIS PAGE BLANK (USPTO)

363	1,04 pmol 5,2 nmol/l	0,6 mg 3 g/l	ad 200 µl
364	0	1,0 mg 5,0 g/l	ad 200 µl
365	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,0 mg 5,0 g/l	ad 200 µl
366	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
367	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
369	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
373	1,04 pmol 5,2 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
374	0,52 pmol 2,6 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl
375	0,26 pmol 1,3 nmol/l	1,5 mg 7,5 g/l	ad 200 µl

Die Eluate von den folgenden vier Filtrationsschritten wurden im Vakuum bis zur Trockne zentrifugiert und die erhaltenen Substanzen in 10 µl der mobilen Phase der HPLC (vergl. Beispiel 1) kurz vor der LC-Analyse mittels Ultraschall in Lösung gebracht.

5

Tabelle 7: Ergebnisse

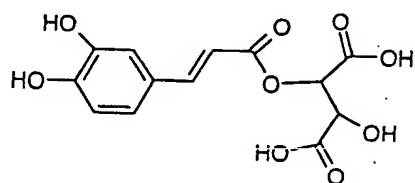
Probe	Substanz	Filtrat [nmol/l]	1. Waschung [nmol/l]	2. Waschung [nmol/l]	Freisetzung [nmol/l]
351	L3	740,3	51,0	8,0	11,9
	L6	5970,7	15045	750,8	195,0
	L7	3802,1	748,2	145,5	22,7
355	L3	353,5	88,8	12,9	15,8
	L6	1482,0	451,4	100,4	707,0
	L7	1539,6	909,9	180,4	214,5
356	L3	961,9	79,0	9,9	26,3
	L6	1848,6	600,1	202,1	2199,1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

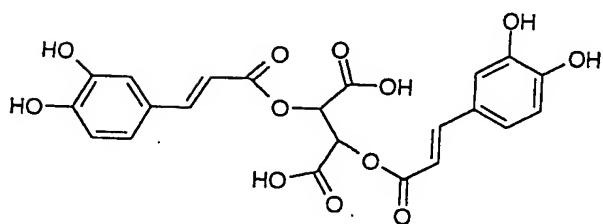
	L7	2183,1	1117,4	295,9	510,7
360	L3	411,5	22,7	0	8,1
	L6	2935,2	468,9	140,3	34,7
	L7	1268,8	129,6	6,6	8,6
361	L3	537,0	16,5	29,6	11,2
	L6	1588,2	146,5	124,3	138,1
	L7	1268,8	129,6	6,6	8,6
362	L3	650,1	20,5	5,6	3,2
	L6	3446,6	958,0	351,4	85,4
	L7	1423,2	176,5	33,7	7,5
363	L3	736,9	54,4	0	8,7
	L6	1180,6	248,3	142,0	257,0
	L7	1740,7	76,4	104,2	16,9
364	L3	1034,4	36,9	3,0	5,3
	L6	3752,4	1377,0	627,8	151,3
	L7	1829,6	92,7	30,1	89,6
365	L3	1221,4	51,7	8,6	9,8
	L6	2291,6	626,7	141,6	436,9
	L7	2746,8	74,0	11,2	111,9
366	L3	2088,5	102,8	2,3	7,6
	L6	5581,8	620,0	181,5	504,8
	L7	4261,6	1425,3	213,1	168,2
367	L3	2310,8	46,2	15,6	6,3
	L6	5159,0	832,5	274,6	616,8
	L7	6243,7	1509,0	199,2	232,9
369	L3	2381,4	90,8	41,8	7,0
	L6	7449,7	478,1	341,9	674,0
	L7	3505,8	986,8	221,7	378,7
373	L3	2450,0	91,7	26,6	36,2
	L6	5562,6	182,7	277,1	2096,1
	L7	4900,2	1176,5	285,4	847,8
374	L3	2593,2	44,0	7,4	25,3
	L6	8589,0	1062,4	476,6	1015,4
	L7	5661,6	627,7	200,9	538,8
375	L3	2252,1	39,7	19,6	19,0
	L6	10838,5	921,1	433,9	279,9
	L7	4921,4	631,3	112,3	154,4

THIS PAGE BLANK (USPTO)

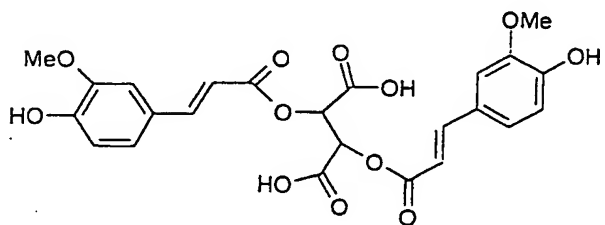
Die drei "gefishchten", d. h. durch Komplexbildung und anschliessende Freisetzung aus dem Komplex erhaltenen Liganden (L3 = trans-Caftarinsäure, L6 = trans-Chicorinsäure und L7 = trans-Diferoyl-weinsäureester) konnten mittels UV, ¹H-NMR und MS identifiziert werden.



L3



L6



L7

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1 zeigt eine symbolische Darstellung der Bildung des mindestens einen Komplexes. Zu einem Gemisch von 1000 verschiedenen, nicht equimolaren chemisch einheitlichen Substanzen (davon vier aktiven) wird ein Target hinzugefügt. Es entstehen vier verschiedene Komplexe, die jeweils eine der aktiven chemischen Substanz gebunden enthalten. Die 996 inaktiven Substanzen können dann mittels Ultrafiltration von den Komplexen abgetrennt werden. Es bedeuten:

- 1 = Target
- 2 = diverse aktive chemische Substanzen
- 3 = diverse inaktive chemische Substanzen (Punkte)
- 4 = verschiedene Komplexe mit mindestens einer aktiven chemischen Substanz

Die Fig. 2 zeigt:

- A) Gemisch chemischer Substanzen mit Inhibitor CRC 220
Clonidin-HCl (4,6 min), CRC 220 (6,9 min), Bromhexin (12,3 min), Amitryptilin (17,6 min), Chlorpromazin-HCl (23,9 min), Chlorprothixen-HCl (26,9 min)
- B) Filtrat ohne Target [Blindprobe]
- C) Filtrat mit Target Thrombin [Hauptversuch]

Die in Fig. 3 enthaltenen Chromatogramme zeigen:

- A) Taraxacun (Blindprobe)
- B) Taraxacum (Hauptversuch)
- C) Taraxacum Freisetzung

Die Differenz zwischen Blindprobe und Hauptversuch zeigt, dass ca. 12 Substanzen gebunden sind, während die durch die Freisetzungsmethode nur 3 Substanzen ermittelt werden konnten.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Patentanprüche

1. Verfahren zur Isolierung und / oder Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus einem Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen, gekennzeichnet durch die Schritte:
- 5
- a) Hinzufügen eines Targets zu diesem Gemisch und Bildung eines Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches,
- b) Abtrennung des Komplexes von den inaktiven chemischen Substanzen des Gemisches, und
- 10
- entweder
- c) Freisetzung und Isolierung und / oder Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus dem abgetrennten Komplex
- oder
- 15
- d) Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches durch Differenzbildung eines Chromatogramms des Gemisches aktiver und inaktiver chemischer Substanzen und eines Chromatogramms des nach Abtrennung des Komplexes erhaltenen Gemisches inaktiver chemischer Substanzen und ggf. Freisetzung
- 20
- und Isolierung der mindestens einen aktiven Substanz aus dem abgetrennten Komplex.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Hinzufügen des Targets zu dem Gemisch von chemischen Substanzen in einer Lösung, einer Suspension oder einer Dispersion erfolgt.
- 25
3. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass Hinzufügen in einer wässrigen Lösung erfolgt.
4. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert der wässrigen Lösung mit Hilfe eines geeigneten Puffers stabilisiert wird.
- 30
5. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der Komplex durch eine Bindung zwischen der

THIS PAGE RI ANK (ISPTO)

mindestens einen aktiven chemischen Substanz und dem Target hergestellt wird.

6. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der Bindung um eine kovalente oder nicht-kovalente Bindung handelt.
7. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei der nicht-kovalenten Bindung um Wasserstoffbrücken, elektrostatische Wechselwirkungen, Metallkomplexierung, Wechselwirkungen von lipophilen Gruppen der aktiven chemischen Substanz mit dem Target, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder um Kation- π -Wechselwirkungen handelt.
8. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Abtrennung des Komplexes von den inaktiven chemischen Substanz mittels Ultrafiltration, Ultrazentrifugation oder anderer geeigneter Methoden erfolgt.
9. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Isolierung und / oder Identifizierung der mindestens einen aktiven chemischen Substanz des abgetrennten Komplexes mit Methoden wie HPLC, Elektrochromatografie, Elektrophorese, Kopplungstechniken wie LC-MS oder MS-MS, vorzugsweise mittels Mikro-Kapillar- oder Nano-HPLC erfolgt.
10. Verfahren erfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Identifizierung der mindestens einen aktiven chemischen Substanz des Gemisches mit Methoden wie HPLC, Elektrochromatografie, Elektrophorese, Kopplungstechniken wie LC-MS oder MS-MS, vorzugsweise mittels Mikro-Kapillar- oder Nano-HPLC erfolgt.
11. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Abtrennung der mindestens einen aktiven chemischen Substanz aus dem Gemisch mittels präparativer HPLC, Elektrochromatografie oder Elektrophorese erfolgt.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

12. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen eine Substanzbibliothek, erhalten aus synthetischer oder kombinatorischer Chemie, oder ein Naturstoffextrakt ist.
- 5 13. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch chemischer Substanzen ein chemisch modifizierter Naturstoffextrakt ist.
14. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch chemischer Substanzen ein Gemisch verschiedener Naturstoffextrakte ist.
- 10 15. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen mindestens 50 verschiedene chemische Substanzen enthält.
16. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Target ein Protein ist.
- 15 17. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Target ein Enzym, ein Rezeptor, ein Antikörper, eine biologischen Membran oder eine Zelle ist.
18. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Target das Enzym Thrombin ist.
- 20 19. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Target der Rezeptor Trypsin ist.
20. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Target der β_2 -Adrenozeptor ist.
- 25 21. Vorrichtung zur kombinierten Durchführung des Verfahrens gemäss Anspruch 1.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ZUSAMMENFASSUNG

1. Ein Verfahren zur Isolierung und / oder Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus einem Gemisch aktiver und inaktiver chemischer Substanzen ist gekennzeichnet durch die Schritte:

- a) Hinzufügen eines Targets zu diesem Gemisch und Bildung eines Komplexes aus Target und mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches,
b) Abtrennung des Komplexes von den inaktiven chemischen Substanzen des Gemisches, und

entweder

- c) Freisetzung und Isolierung und / oder Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz aus dem abgetrennten Komplex

oder

- d) Identifizierung mindestens einer aktiven chemischen Substanz des Gemisches durch Differenzbildung eines Chromatogramms des Gemisches aktiver und inaktiver chemischer Substanzen und eines Chromatogramms des nach Abtrennung des Komplexes erhaltenen Gemisches inaktiver chemischer Substanzen und ggf. Freisetzung und Isolierung der mindestens einen aktiven Substanz aus dem abgetrennten Komplex.

THIS PAGE RI ANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

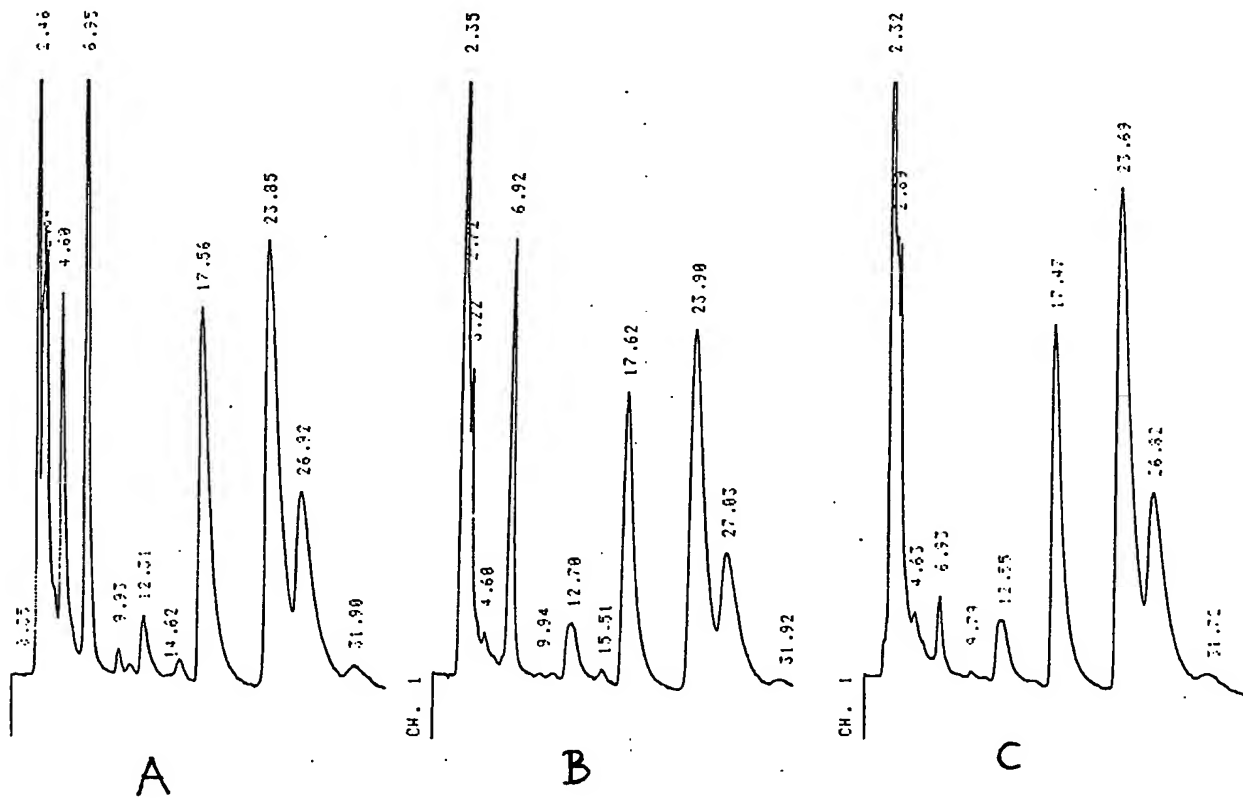
Abbildung 2: Chromatogramme eines Gemisches aktiver und inaktiver chemischer Substanzen, sowie von Hauptversuch und Blindprobe.

A) Gemisch chemischer Substanzen mit Inhibitor CRC 220

Clonidin-HCl (4,6 min), CRC 220 (6,9 min), Bromhexin (12,3 min), Amitryptilin (17,6 min), Chlorpromazin-HCl (23,9 min), Chlorprothixen-HCl (26,9 min)

B) Filtrat ohne Target [Blindprobe]

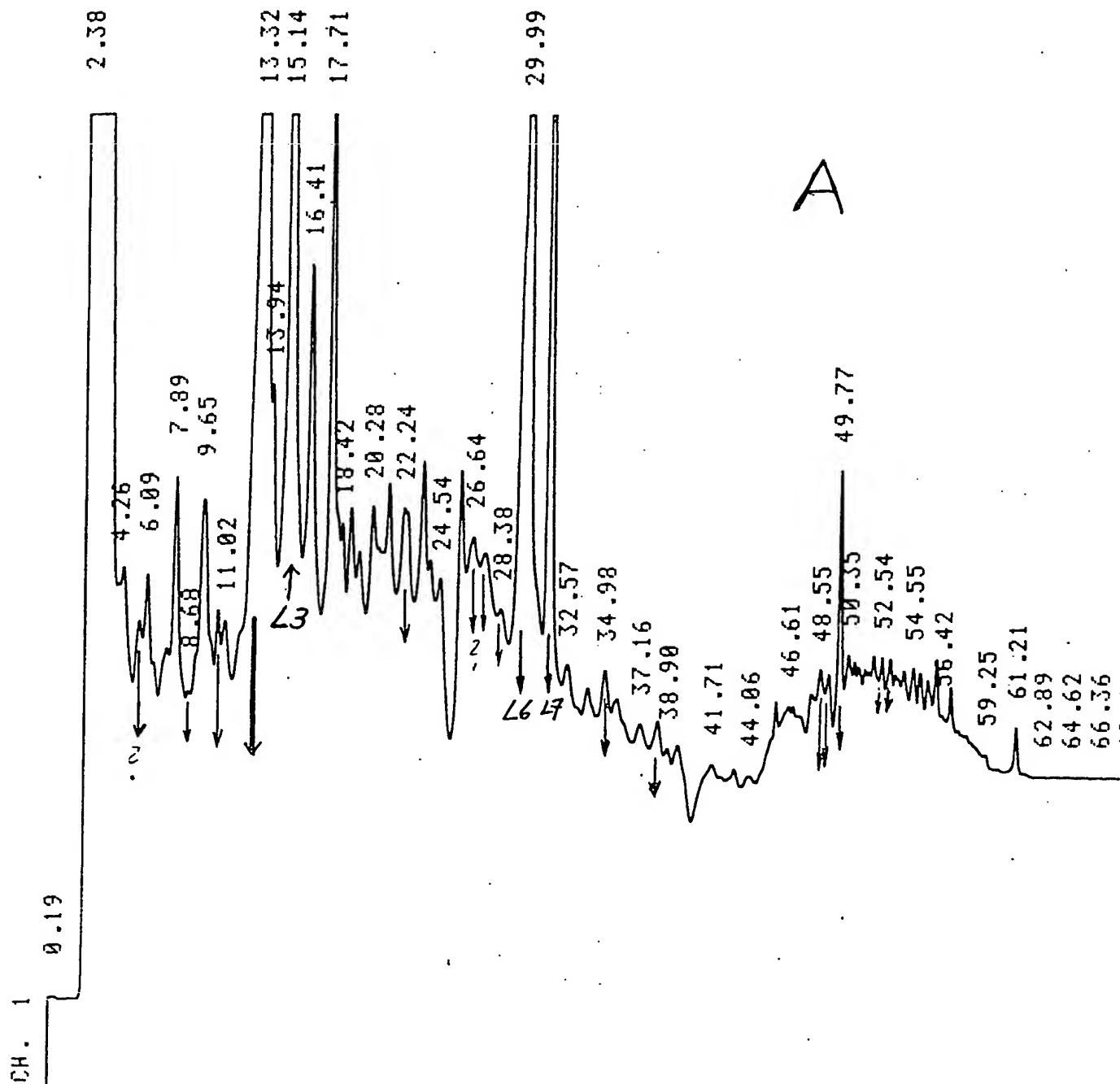
C) Filtrat mit Target Thrombin [Hauptversuch]



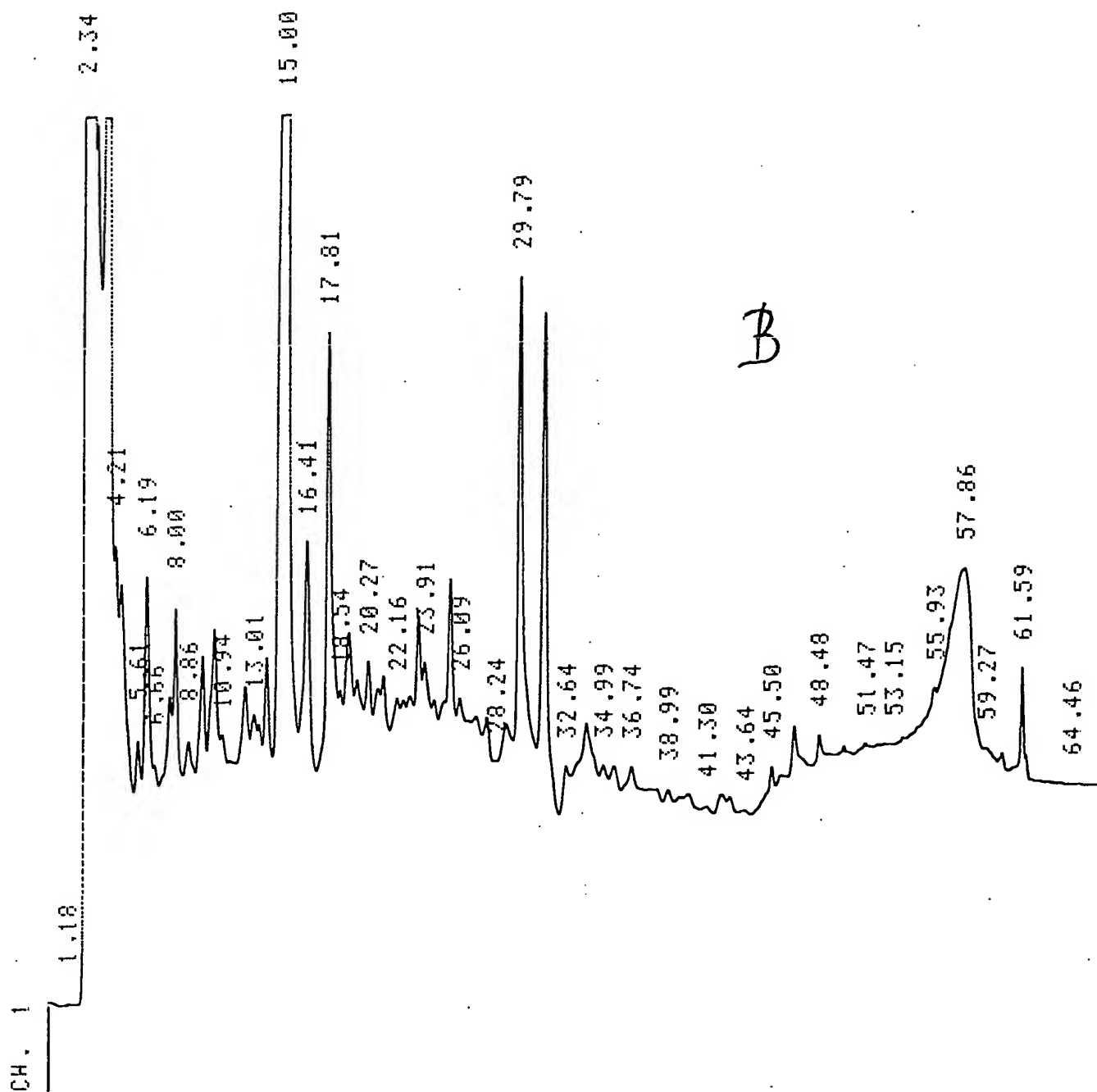
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Abbildung 3: Chromatogramme:

- A) Taraxacum (Blindprobe)
- B) Taraxacum (Hauptversuch)
- C) Taraxacum Freisetzung

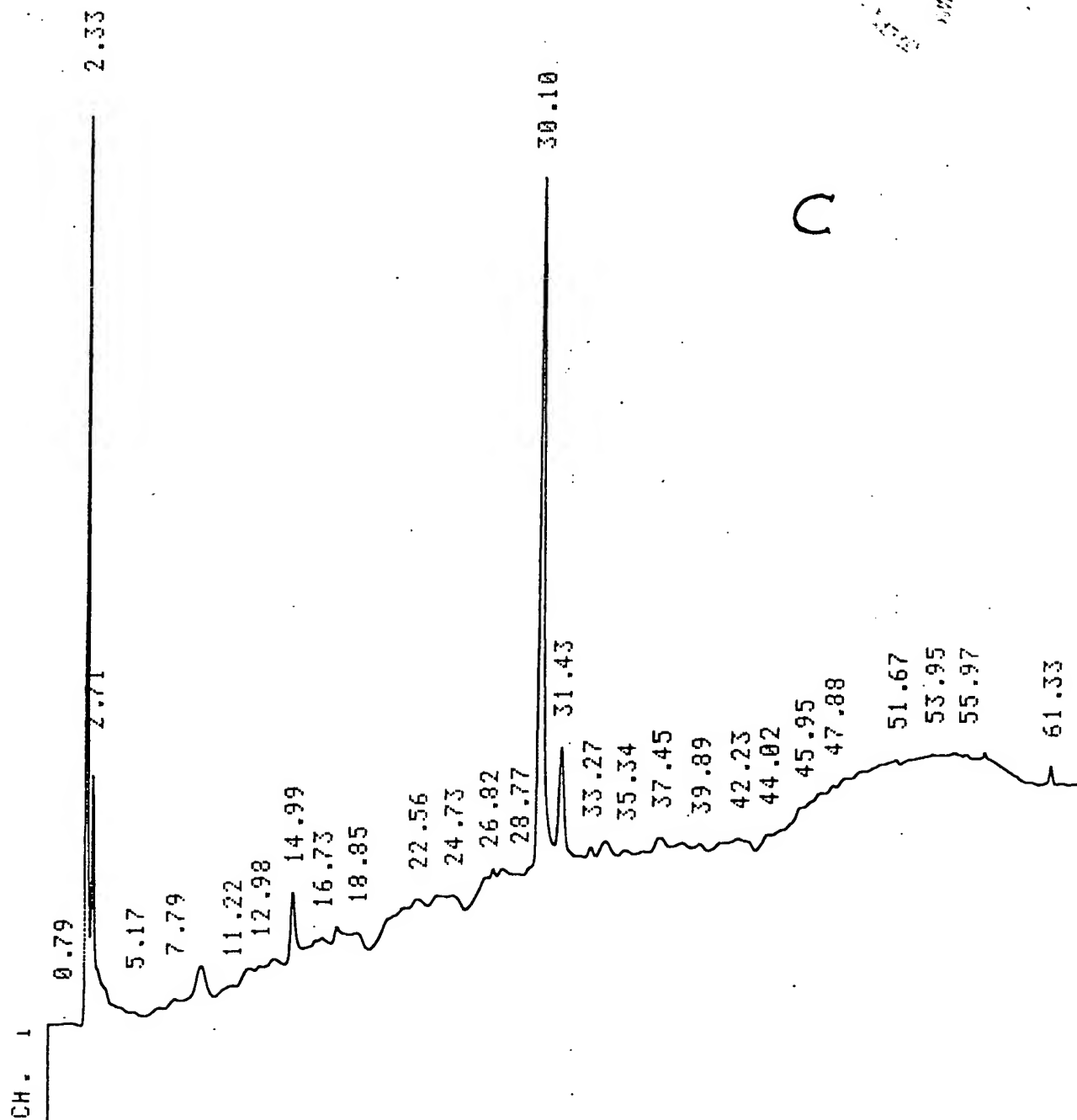


THIS PAGE BLANK (USPTO)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Anmeldungstext ≠ Priorität



THIS PAGE BLANK (USPTO)